Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

J. BONNER - PASADENA, **A. ERNST** - ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG** - ROSTOCK
R. HARDER - GÖTTINGEN, **O. RENNER** - MÜNCHEN, **W. SCHUMACHER** - BONN

HERAUSGEGEBEN VON

W. RUHLAND UNTERDEUFSTETTEN — **L. BRAUNER** MÜNCHEN — **E. BÜNNING** TÜBINGEN

50. BAND, 1. HEFT

MIT 42 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 26. SEPTEMBER 1957)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1957

Planta (Berl.)

Preis DM 21.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E). Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*.

Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotographien u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Wilhelm Ruhland, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim*, oder an *Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Inst. der Universität.*

Springer-Verlag

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 249251
und
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901

50. Band **Inhaltsverzeichnis** 1. Heft

Bartels, P., und H.-O. Schwantes, Mikrospektrographische Messungen zur Aufnahme und Speicherung von Neutralrot durch lebende Zellen von Allium cepa. Mit 14 Textabbildungen 1

Libbert, E., Die Regulation des Wurzelwachstums durch synthetische und endogene Inhibitoren. Mit 1 Textabbildung 25

Freytag, K., Über die Doppelbrechungserscheinungen an Zellwand und Cuticula von Drüsenhaaren. Mit 3 Textabbildungen 41

Girbardt, M., Der Spitzenkörper von Polystictus versicolor (L.). Mit 6 Textabbildungen 47

Michaelis, P., Genetische, entwicklungsgeschichtliche und cytologische Untersuchungen zur Plasmavererbung. II. Mitteilung. Über eine Plastidenmutation mit intracellularer Wechselwirkung der Plastiden, zugleich ein Beitrag zur Methodik der Plasmonanalyse und zur Entwicklungsgeschichte von Epilobium. Mit 18 Textabbildungen 60

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Planta, Bd. 50, S. 1—24 (1957)

Aus dem Botanischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen

MIKROSPEKTROGRAPHISCHE MESSUNGEN ZUR AUFNAHME UND SPEICHERUNG VON NEUTRALROT DURCH LEBENDE ZELLEN VON ALLIUM CEPA

Von

PETER BARTELS und HANS-OTTO SCHWANTES

Mit 14 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Mai 1957)

Die Untersuchung der Stoffaufnahme durch lebende Pflanzenzellen vermag wichtige Hinweise auf die dabei beteiligten Prozesse und wirksam werdenden Mechanismen zu geben. Wie in zwei vorhergehenden Arbeiten (BARTELS 1954, BARTELS und SCHWANTES 1955) gezeigt werden konnte, läßt sich die Aufnahme und Speicherung organischer Farbstoffe durch einzelne Zellen mit Hilfe einer mikrospektrographischen Meßanordnung verfolgen. Es können dabei nicht nur quantitative Aussagen über die Zeit-, Außenkonzentrations- und p_H-Abhängigkeit der Stoffaufnahme gemacht, sondern darüber hinaus Gesetzmäßigkeiten aufgefunden werden, die im Falle des basischen Vitalfarbstoffs Acridinorange (AO) (BARTELS 1954) die Berechnung der Aufnahme mit Hilfe einer Differentialgleichung gestatteten. Nachdem sich bei der Untersuchung der Aufnahme und Speicherung des basischen Farbstoffes Thionin (BARTELS und SCHWANTES 1955) herausgestellt hatte, daß auch hinsichtlich ihres physikalisch-chemischen Verhaltens durchaus ähnliche Farbstoffe offenbar sehr verschiedenen Aufnahme- und Speicherungsbedingungen unterworfen sind, erschien die Untersuchung eines weiteren basischen Farbstoffs interessant.

Der basische Phenazinfarbstoff Neutralrot wird zu den Vacuolenfarbstoffen gerechnet. Er gilt als einer der ungiftigsten Vitalfarbstoffe (WIEDE und MEYER 1955). Das Neutralrot wurde 1898 von KÜSTER in die Vitalfärbetechnik eingeführt. Grundlegende Arbeiten, welche über Aufnahme und Speicherung des Neutralrots berichten, stammen von RUHLAND (1908, 1912), STRUGGER (1935), STRUGGER (1936), CZAJA (1937), DRAWERT (1937, 1938, 1940), STRUGGER (1940), COLLANDER, LÖNEGREN und ARHIMO (1943), BAZIN (1944, 1946), HÖFLER (1947), DRAWERT (1948), KÖLBEL (1948), MURAKAMI (1957).

Zur Kenntnis des Farbstoffverhaltens

Die Dissoziationsverhältnisse des Neutralrots wurden von DRAWERT (1940, 1948) an Hand eines Dissoziationsschemas dargestellt. Eine

Neubearbeitung erfolgte durch KÖLBEL (1948). Da jedoch für die vorliegende Arbeit eine eingehende Untersuchung des Gesamtfarbstoffverhaltens unumgänglich erschien, wurde das physikalisch-chemische Verhalten des Neutralrots in zwei vorhergehenden Arbeiten (BARTELS 1956) ausführlich untersucht. Dort ist auch die physikalisch-chemische Literatur aufgeführt. Es soll daher an dieser Stelle nur das Wichtigste wiederholt werden. In wäßriger Lösung liegt das Neutralrot im Bereich von p_H 13 bis etwa p_H 7,5 als ungeladenes Molekül vor. Es wird dann mit einem p_K von 7,38 in ein einfach positiv geladenes Kation NR_I^+ umgewandelt, welches sehr wahrscheinlich eine Struktur aufweist, bei der das erste Proton nicht am Ringstickstoff in 10-Stellung, sondern am Kohlenstoffatom in 5-Stellung angelagert ist. Diese Form mit der Carbenium-Struktur wandelt sich mit einem p_K von 5,89 durch Protonenumlagerung in ein einfach positiv geladenes Kation NR_{II}^+ um, bei dem das Proton am Ringstickstoff gebunden ist. Letzteres Kation weist in seinem gesamten spektroskopischen wie physikalisch-chemischen Verhalten eine weitgehende Ähnlichkeit mit dem einwertigen Acridin-

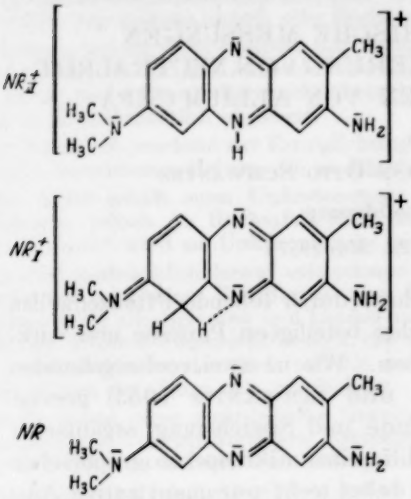


Abb. 1. Prototrope Strukturen des Neutralrots im mittleren p_H-Bereich

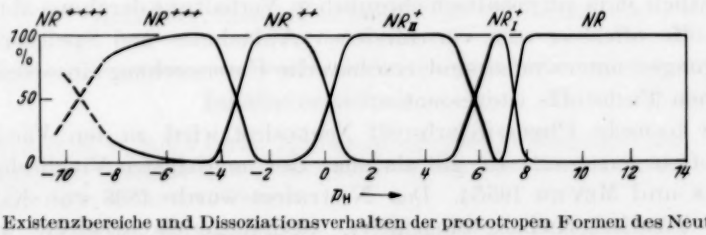


Abb. 2. Existenzbereiche und Dissoziationsverhalten der prototropen Formen des Neutralrots

orangekation AO^+ auf. Wie dieses unterliegt es einem Assoziationsgleichgewicht, für das die Bildung von Dimeren in der ersten Assoziationsstufe und das Entstehen höherer Assoziate, welche als Tetramere erkannt werden konnten, bei noch höheren Konzentrationen nachgewiesen wurde.

Abb. 1 zeigt die verschiedenen prototropen Strukturen des Neutralrots im interessierenden p_H-Bereich, Abb. 2 deren Existenzbereiche. In Abb. 3 ist der prozentuale Gehalt an Monomeren und Assoziaten in Abhängigkeit von der Konzentration bei p_H 2,0 aufgetragen.

Es bleibt zu erwähnen, daß das Neutralrot zu den in der Vacuole nur schwer reduzierbaren Vitalfarbstoffen gehört (KIERMAYER 1955; DRAWERT 1953, 1954; BETZ 1953), so daß die in den Einzelzellen gemessenen Konzentrationswerte keinen durch Reduktionsvorgänge hervorgerufenen Fehler enthalten dürften.

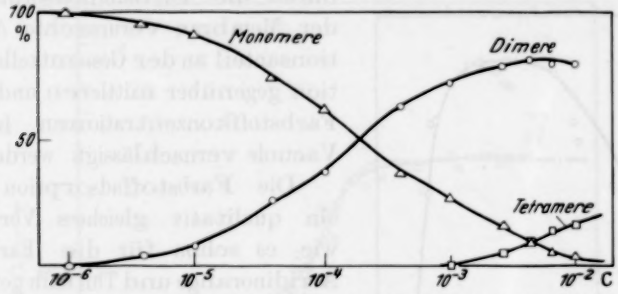


Abb. 3. Assoziationsverhältnisse des NR_{II}^{+}-Kations bei p_H 2,0

Meßanordnung, Versuchsmaterial und Auswertmethodik

Meßanordnung, Versuchsmaterial und Aufarbeitung desselben entsprechen den bereits früher (BARTELS 1954, BARTELS u. SCHWANTES 1955) gemachten Angaben. Die Größe des Meßbereichs in der Zelle wurde jedoch weiter auf $4 \times 4\ \mu$ reduziert. Das verwendete Neutralrot war, wie in der Farbstoffarbeit (BARTELS 1956a) beschrieben, sorgfältigst gereinigt. Es wurde bei den Messungen streng darauf geachtet, daß die Präparate nur kurze Zeit unter Deckglasabschluß blieben, um unerwünschte Farbstoffumlagerungen auszuschließen (STRUGGER 1936). Bezüglich der Methodik der Auswertung sei ebenfalls auf die bereits zitierten Arbeiten (BARTELS 1954, BARTELS u. SCHWANTES 1955) verwiesen. Beim Neutralrot ergeben sich jedoch etwas abweichende Verhältnisse durch die Tatsache, daß im interessierenden p_H-Bereich zwei Prototropiegleichgewichte vorliegen, und das Spektrum des NR_{II}^{+}-Kations gerade im Wellenlängengebiet der beiden sehr nahe beieinandergelegenen isosbestischen Punkte dieser Gleichgewichte eine starke Konzentrationsabhängigkeit aufweist. Es liegen mehrere gekoppelte Gleichgewichte vor. Die Messungen wurden daher bei einer größeren Anzahl von Wellenlängen durchgeführt, so daß durch die Bestimmung des relativen Absorptionskurvenverlaufs und ein einfaches schrittweises Näherungsverfahren die Ermittlung der richtigen Konzentrationswerte mit der gewünschten Genauigkeit möglich war. Mit besonderer Sorgfalt wurden die Korrekturwerte für die Absorption des an der Membran adsorbierten Farbstoffs ermittelt.

Experimentelle Ergebnisse

Messung der Farbstoffkonzentration an der Membran

Die Absorption wurde an kleinen, durch Plasmolyse freigelegten Membranbezirken gemessen. Die Zellen wurden 900 sec lang in $1 \cdot 10^{-4}$ molarer Neutralrotlösung eingefärbt, die durch 0,015 molaren Na-K-Phosphatpuffer auf den gewünschten p_H-Wert eingestellt war. Danach wurde 600 sec lang in einer farbstofffreien Pufferlösung gleichen p_H-Wertes

ausgewaschen, die doppelt so konzentriert angesetzt und dann zu gleichen Teilen mit 2 molarer Rohrzuckerlösung vermischt war. Der untersuchte p_H-Bereich umfaßte die Werte von p_H 2,0 bis p_H 8,0. Die Meßergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt. Jeder Meßpunkt entspricht dem Mittelwert aus 100 Einzelmessungen. Von p_H 6,75 an kann der durch die Farbstoffadsorption an der Membran verursachte Absorptionsanteil an der Gesamtzellabsorption gegenüber mittleren und hohen Farbstoffkonzentrationen in der Vacuole vernachlässigt werden.

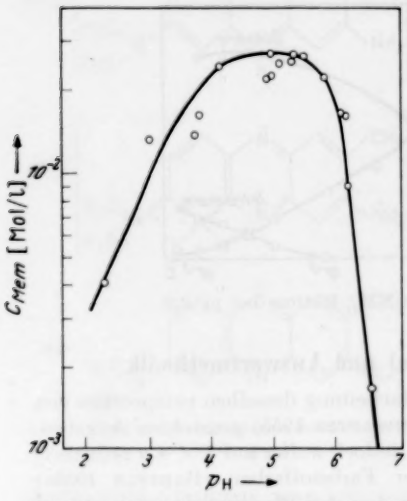


Abb. 4. Neutralrotadsorption an der Membran

Die Farbstoffadsorption zeigt ein qualitativ gleiches Verhalten, wie es schon für die Farbstoffe Acridinorange und Thionin gefunden wurde: die Adsorption strebt einem Sättigungswert zu, der für die genannten Farbstoffe zwischen $1{,}2 \cdot 10^{-2}$ und $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ Mol/Liter liegt. Der Konzentrationsabfall auf der alkalischen Seite ist bedeutend steiler als der Anstieg, so daß ein asymmetrischer Verlauf entsteht.

p_H-*Abhängigkeit der Speicherung in der Vacuole*

Die p_H-Abhängigkeit der Farbstoffaufnahme in die Vacuole wurde im Bereich von p_H 2,0 bis p_H 11,0 untersucht. Für den Bereich, in dem Membran- und Vacuolenfärbung nebeneinander vorliegen, wurde eine entsprechende Korrektur auf die Membranabsorption vorgenommen. Die Konzentration der Farblösung betrug $1 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter, die Färbezeit 900 sec, die Auswaschzeit im Puffer gleichen p_H-Wertes 600 sec. Jede Meßreihe umfaßte 100 Messungen, deren Mittelwert in Abb. 5 als Meßpunkt eingetragen ist. Es wurde für jede derartige Meßreihe ein Epidermisstück einer anderen Zwiebel verwendet. Die Streuung um die als Meßpunkte eingetragenen Mittelwerte entspricht den in Abb. 9 für die entsprechenden Gesamtinnenkonzentrationen festgestellten Streuungsmaßen.

Die Farbstoffaufnahme setzt bereits bei p_H 5,0 in meßbarem Grade ein. Hier zeigt sich eine wichtige Abweichung von dem beim Acridinorange und beim Thionin festgestellten Verhalten: die Kurve zeigt einen stufenförmigen Verlauf, wobei der zweite, aber nur dieser Teil der Kurve eine Beziehung zur Konzentration undissoziierter Farbbasenmoleküle erkennen läßt. Die strichpunktierte Kurve gibt die Konzentration der

Farbbasenmoleküle in der Außenlösung als Funktion der c_H an. Die Werte sind zur Anpassung mit dem willkürlich gewählten Faktor 27 multipliziert. Man erkennt die erwähnte Entsprechung. Zwischen p_H 7,5 und p_H 11,0 liegt eine ausgeprägte Vacuolenfärbung, verbunden mit Vacuolenkontraktion vor.

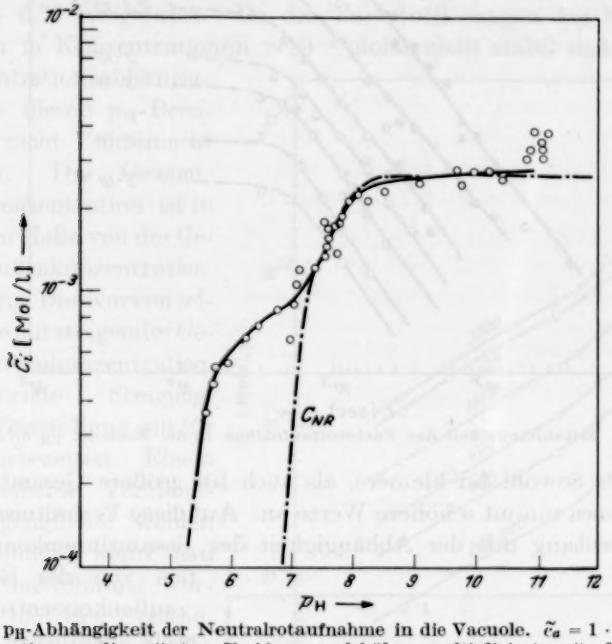


Abb. 5. p_H-Abhängigkeit der Neutralrotaufnahme in die Vacuole. $\tilde{c}_a = 1 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter. Konzentration undissoziierter Farbbasenmoleküle, multipliziert mit dem willkürlich gewählten Faktor 27: —·—·—

Abhängigkeit der Farbstoffaufnahme von der Färbezeit

Die angewandten Färbezeiten umfassen Intervalle von 30 bis 3000 sec. Untersucht wurde der zeitliche Verlauf der Farbstoffaufnahme bei p_H 6,75 für die Gesamtaußenkonzentrationen $1 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $2{,}5 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-4}$ und $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter, und außerdem bei p_H 9,6 für die Konzentration $1 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter. Jeder Meßpunkt der Abb. 6 entspricht dem Mittelwert aus 100 Einzelzellen.

Man erkennt, daß bei p_H 6,75 die Gesamtinnenkonzentration für alle Gesamtaußenkonzentrationen angenähert linear mit der Färbezeit ansteigt, um nach etwa 3000 sec einen stationären Endwert zu erreichen.

Definiert man, wie es bereits früher (Bartels 1954) geschehen ist, als Speicherungsfaktor σ das Verhältnis der Gesamtinnenkonzentration $\tilde{c}_i$ zur Gesamtaußenkonzentration $\tilde{c}_a$, so erkennt man, wie Abb. 10 zeigt, daß σ nur für den kleinen Konzentrationsbereich $5 \cdot 10^{-3}$ bis $1 \cdot 10^{-3}$ Mol je Liter einen annähernd konstanten Wert besitzt, der für $t = 3000$ sec

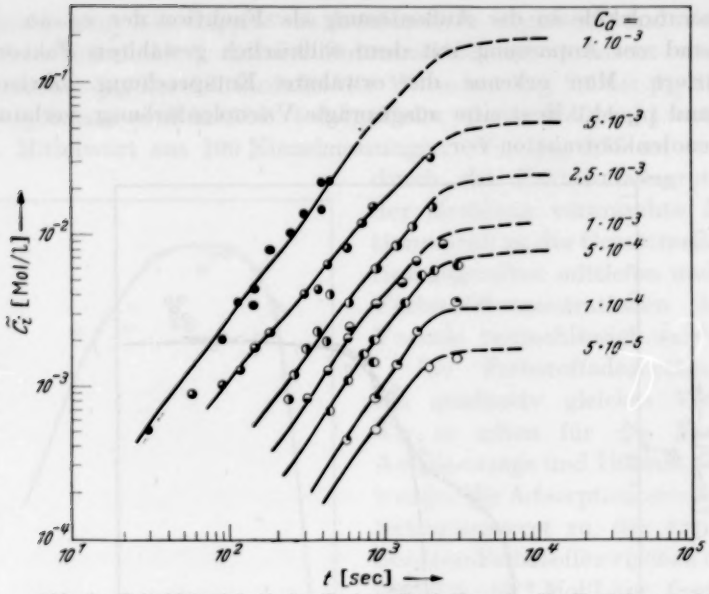


Abb. 6. Zeitabhängigkeit der Farbstoffaufnahme in die Vacuole. p_H 6,75

10,4 beträgt. Sowohl für kleinere, als auch für größere Gesamtaußenkonzentrationen nimmt σ höhere Werte an. Auf diese Verhältnisse wird im Zusammenhang mit der Abhängigkeit der Gesamtinnenkonzentration von der Gesamtaußenkonzentration noch ausführlich eingegangen.

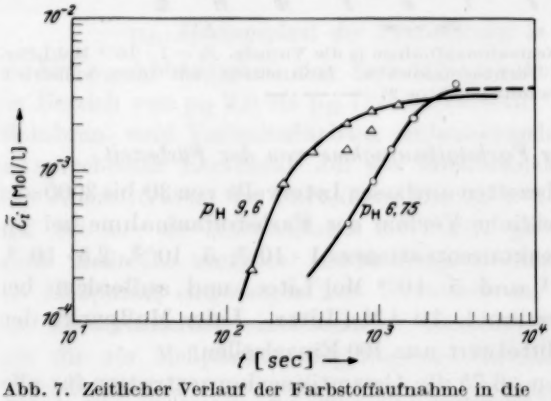


Abb. 7. Zeitlicher Verlauf der Farbstoffaufnahme in die Vacuole bei p_H 6,75 und p_H 9,6. $\tilde{c}_a = 1 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter

Ein Vergleich dieser Meßergebnisse mit denjenigen zur zeitlichen Zunahme der Gesamtinnenkonzentration bei p_H 9,6, die in Abb. 7 dargestellt sind, ist für unsere Kenntnis der bei der Stoffaufnahme wirksamen Mechanismen von großem Interesse. Zum Vergleich ist in Abb. 7 noch einmal der Verlauf bei p_H 6,75 für die gleiche Konzentration, nämlich $1 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter eingezeichnet.

Es ist klar zu erkennen, daß die Farbstoffaufnahme bei p_H 9,6 schneller erfolgt, der Speicherungsfaktor jedoch nur sehr unwesentlich

erniedrigt ist und demzufolge der Gleichgewichtszustand früher, nämlich nach bereits 1000 sec, erreicht wird.

Abhängigkeit der Farbstoffaufnahme von der Gesamtaußenkonzentration

Die Meßergebnisse sind in Abb. 8 dargestellt. Alle Messungen wurden bei p_H 6,75 ausgeführt. Da die Farbstofflösungen bei höheren p_H-Werten in Konzentrationen $>10^{-4}$ molar nicht stabil sind, konnte die Konzentrationsabhängigkeit in diesen p_H-Bereichen nicht untersucht werden. Die Gesamtinnenkonzentration ist in starkem Maße von der Gesamtaußenkonzentration abhängig. Die Kurven zeigen eine mit steigender Gesamtaußenkonzentration zunehmende Steigung. Diese Feststellung gilt für alle Färbezeiten. Einem unmittelbaren Verständnis zugänglicher werden die Befunde, wenn man eine Umzeichnung vornimmt und den Speicherungsfaktor σ über der Gesamtaußenkonzentration aufträgt, wie es in Abbildung 10 getan worden ist.

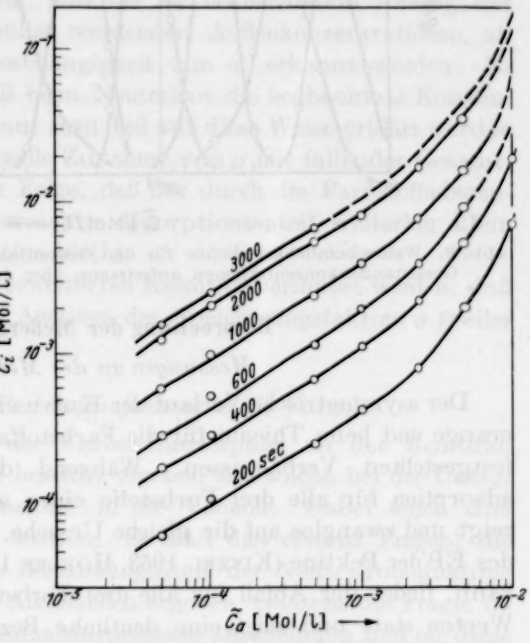


Abb. 8. Außenkonzentrationsabhängigkeit der Neutralrotaufnahme in die Vacuole

Ergebnis der statistischen Auswertung

In Abb. 9 ist das Ergebnis der statistischen Auswertung graphisch dargestellt, und zwar ist der Verlauf der Wahrscheinlichkeitsdichte für die Gesamtinnenkonzentration aufgetragen über der Gesamtinnenkonzentration mit der Gesamtaußenkonzentration als Parameter. Die Berechnung erfolgte nach dem bereits früher angewandten (BARTELS 1954) und im mathematischen Anhang einer späteren Arbeit (BARTELS und SCHWANTES 1955) abgeleiteten analytischen Verfahren. Die Darstellung soll einen Überblick über die Streuung der in den Zellen vorliegenden Gesamtinnenkonzentrationen geben.

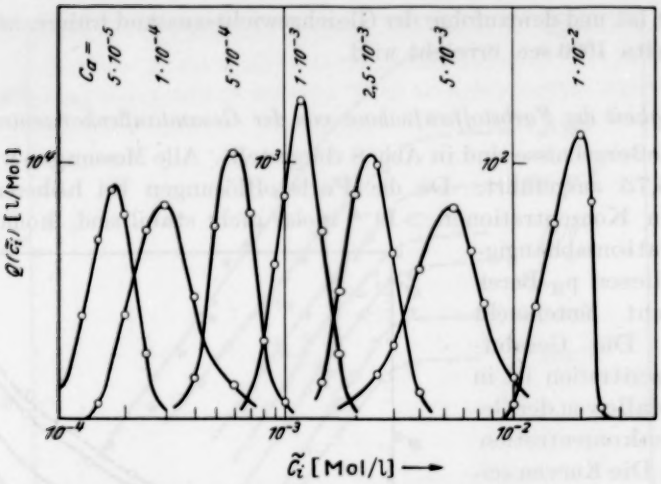


Abb. 9. Wahrscheinlichkeitsdichte für die Gesamtinnenkonzentration für verschiedene Gesamtaußenkonzentrationen aufgetragen über der Gesamtinnenkonzentration

Besprechung der Meßergebnisse

Messungen an der Membran

Der asymmetrische Verlauf der Kurve entspricht den beim Acridinorange und beim Thionin für die Farbstoffadsorption an der Membran festgestellten Verhältnissen. Während die einsetzende Farbstoffadsorption für alle drei Farbstoffe einen annähernd gleichen Verlauf zeigt und zwanglos auf die gleiche Ursache, nämlich das Überschreiten des EP der Pektine (KINZEL 1953, HÖFLER 1946), zurückgeführt werden kann, findet der Abfall für alle drei Farbstoffe bei verschiedenen p_H-Werten statt und zeigt eine deutliche Beziehung zum Einsetzen der Vacuolenspeicherung, wie es auch von allen bisherigen Beobachtern beschrieben worden ist. Die in Abb. 4 dargestellte Kurve bestätigt im wesentlichen die Angaben DRAWERTS (1937) und STRUGGERS (1940), die den Umschlagspunkt zwischen p_H 6,4 und 7,1 angeben.

Der Isokonzentrationspunkt IKP des Neutralrots liegt bei p_H 6,8 mit einer Konzentration von $8{,}8 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter. Das bedeutet, daß oberhalb von p_H 6,8 der sehr viel geringeren Membranschichtdicke wegen der Absorptionsanteil des an der Membran gebundenen Farbstoffs für die $\tilde{c}_a$ $1 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter maximal etwa 4% der Gesamtzellabsorption beträgt und daher vernachlässigt werden kann. Gleiches kann für alle $\tilde{c}_a > 10^{-4}$ Mol/Liter und die ihnen entsprechenden erhöhten Gesamtinnenkonzentrationen gesagt werden, wobei der vernachlässigte Absorptionsanteil für diese entsprechend geringere prozentuale Werte annimmt. Bei $\tilde{c}_a < 10^{-4}$ Mol/Liter und den ihnen entsprechenden geringeren Gesamtinnenkonzentrationen liegen die Verhältnisse

ungünstiger. Die oben gemachte Vernachlässigung ist nicht mehr voll statthaft, da die fest an der Membran adsorbierte Farbstoffmenge nicht an dem außenkonzentrationsabhängigen Gleichgewicht für die Gesamtinnenkonzentration teilnimmt, sondern konstant erhalten bleibt. Falls keine Korrektur vorgenommen wird, scheint daher die Gesamtinnenkonzentration mit fallender Gesamtaußenkonzentration ein immer größer werdendes Vielfaches der letzteren zu werden. Dieser Fall war bereits beim AO besprochen, und der zu beobachtende Anstieg des Speicherungsfaktors bei kleiner werdenden Außenkonzentrationen als „scheinbare Konzentrationsabhängigkeit von σ" erkannt worden. Es wird sich jedoch zeigen, daß beim Neutralrot die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit von σ nur zum Teil auf diese Weise erklärt werden kann. Die anzunehmende reelle Zunahme von σ mit fallender Gesamtaußenkonzentration hat zur Folge, daß der durch die Farbstoffadsorption an der Membran verursachte Absorptionsanteil weiterhin klein gegen die Gesamtzellabsorption bleibt.

Es kann nach der heute erweiterten Kenntnis vermutet werden, daß auch beim AO ein Teil des Anstiegs des Speicherungsfaktors σ reeller Natur ist.

Messungen zur Farbstoffaufnahme in die Vacuole

Während die Messung der Farbstoffadsorption an der Membran keine neuen Gesichtspunkte brachte, ergeben sich solche bei der Untersuchung der Neutralrotaufnahme in die Vacuole. Dabei sollen drei Fragenkomplexe behandelt werden. Es sind dies erstens Fragen, die sich aus der verschiedenen Zeitabhängigkeit der Neutralrotaufnahme im schwach Sauren und im Alkalischen ergeben, zweitens die Frage, ob ein einziger oder mehrere Aufnahmeprozesse anzunehmen und ob diese p_H-abhängig oder aber bereits beim gleichen p_H-Wert nebeneinander vorhanden sind, und drittens Fragen nach den Aufnahme- und Speicherungsmechanismen.

Der stufenförmige Verlauf der Farbstoffaufnahme in die Vacuole als Funktion der c_H ist zwei Erklärungen zugänglich. Entweder permeieren sowohl ungeladene Moleküle als auch das positiv geladene Molekülion NR_1^+, oder aber es vermögen nur ungeladene Moleküle (Irwin 1923; McCutcheon und Lucké 1924; Gutstein 1932; Osterhout 1933; Drawert 1936; Collander, Lönegren und Arhimo 1943; Höfler 1947) im Sinne der Höflerschen Ionenfallentheorie Plasmagrenzschichten und Plasma zu passieren. Im letzteren Falle wäre dann der langsamer erfolgenden Aufnahme bei p_H 6,75 wegen anzunehmen, daß der Diffusionswiderstand des Protoplasten eine p_H-abhängige Erhöhung erfährt. An und für sich würden die Meßkurven nicht gegen eine solche Annahme sprechen, da der Speicherungsfaktor kaum

geändert wird, sondern nur sich das Gleichgewicht bei p_H 9,6 schneller einstellt. Für die erste Möglichkeit spricht einmal, daß die gemessene Stufe mit dem Existenzbereich des Molekülions NR_I^+ zusammenfällt, und zum anderen, daß der Kurvenabschnitt im Alkalischen mit der Konzentration undissoziierter Moleküle eine gute Übereinstimmung zeigt, ferner jedoch auch in gewisser Weise die verschiedene Zeitabhängigkeit der Farbstoffaufnahme bei p_H 6,75 und p_H 9,6. Die Farbstoffaufnahme bei p_H 6,75 erfolgt nicht soviel langsamer, wie es die bei diesem p_H-Wert wesentlich geringere Außenkonzentration undissoziierter NR-Moleküle erwarten lassen sollte. Die Versuche IRWINS (1923) zur Geschwindigkeit der Brillantkresylblau-Aufnahme durch *Nitella* bei verschiedener c_H sind ein gutes Beispiel für die zu erwartende Verlangsamung. Gerade die Messungen zur Zeitabhängigkeit sprechen stark für die Aufnahme auch des Molekülions. Handelte es sich bei der Farbstoffaufnahme bei p_H 6,75 um die Permeation von ungeladenen Molekülen, die in der Außenlösung in außerordentlich geringer Konzentration vorliegen, so sollte man eine Aufnahmekurve erwarten, welche der Kurve für die Farbstoffaufnahme bei p_H 9,6 ähnlich, aber nicht längs der Zeitskala, sondern lediglich auf geringere Innenkonzentrationswerte zu verschoben ist. Diese Deutung der Meßunterlagen steht in einem gewissen Widerspruch zu den Ansichten der oben zitierten Autoren, welche alle das Plasma auf osmotischem Wege nur für ungeladene Moleküle, nicht aber für Ionen permeabel erachten. Es fehlt jedoch nicht an Stimmen, die eine Permeation von Kationen für möglich halten, so diskutieren AXMACHER und NARATH (1934) sowie WILBRANDT (1938) den Einfluß von Donnangleichgewichten und auch KÖLBEL (1948) vertritt eine gleichartige Auffassung. Es ist natürlich die Möglichkeit einer Diffusionswiderstandsänderung der Plasmagrenzschichten allein durch die etwas andere Pufferzusammensetzung nicht auszuschließen. Untersuchungen zur Beeinflussung der Stoffaufnahme durch Ionen wurden u. a. von DE HAAN (1935), BOGEN (1940, 1941) und KREUZ (1941) durchgeführt und starke Abhängigkeiten gefunden.

Über den Aufnahmemechanismus beider prototroper Neutralrotformen ist mit diesen Feststellungen noch keine Aussage gemacht. Es soll vielmehr im Sinne BOGENS (1956a) unter „Permeabilität" eine Eigenschaft der Grenzschicht verstanden werden. Es wird an anderer Stelle diskutiert werden, daß zweifellos nicht nur rein osmotische Prozesse stattfinden, wenn solche auch ganz wesentlich an der Gesamtfarbstoffaufnahme beteiligt sein dürften.

An dieser Stelle möge darauf hingewiesen werden, daß auch bei rein osmotischer Aufnahme eine Speicherung eintreten kann, wenn nämlich die Aufrechterhaltung des Konzentrationsungleichgewichtes keine Energie erfordert. Das ist der Fall bei Adsorptionsprozessen und bei

dem Speicherungsmechanismus, der der Ionenfallenvorstellung zugrunde liegt. Daß die Speicherung vieler organischer Farbstoffe auf der Adsorption an Vacuolenkolloiden beruht, wird von vielen Autoren angenommen (Scarth 1926, Guilliermond und Obaton 1934, Guilliermond 1937, Bünning 1936, Drawert 1948, Perner 1950, Bethe 1950, Bartels 1954).

In beiden Fällen jedoch kann der rein osmotische Charakter der Speicherung verlorengehen. Es können, wie es letzter Zeit von Bogen (1956b) und Neuber (1956) diskutiert worden ist, die adsorbierenden Vacuolenkolloide zur Aufrechterhaltung ihrer eigenschaftsbestimmenden Struktur einer Energiezufuhr bedürfen. Bogen (1956b) nimmt die Existenz atmungsempfindlicher, labiler Glycoproteide an. Ebenso kann auch die Aufrechterhaltung eines c_H-Gefälles stoffwechselempfindlich sein. Dieser letztere Fall ist von Reichenberg und Sutcliffe (1954) ausführlich diskutiert worden. In diesen letzten beiden Fällen spricht man von metaosmotischer Stoffaufnahme.

Tabelle 1

[Umgerechnet nach Angaben von Bazin (1944)]

$\tilde{c}_a$ Mol/Liter	$\tilde{c}_i$	σ
$4 \cdot 10^{-5}$	$1{,}0 \cdot 10^{-4}$	2,5
$1 \cdot 10^{-4}$	$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	2,5
$2 \cdot 10^{-4}$	$6{,}6 \cdot 10^{-4}$	3,3
$4 \cdot 10^{-4}$	$1{,}2 \cdot 10^{-3}$	3,0
$1 \cdot 10^{-3}$	$2{,}0 \cdot 10^{-3}$	2,0
$2 \cdot 10^{-3}$	$4{,}5 \cdot 10^{-3}$	2,25
$4 \cdot 10^{-3}$	$1{,}0 \cdot 10^{-2}$	2,5

Bei den an der Neutralrotaufnahme beteiligten nicht rein osmotischen Prozessen ist hier in erster Linie an metaosmotische Prozesse gedacht (Bogen und Prell 1953), da sich nichtosmotische Prozesse, wie sie Rosenberg (1948), Rosenberg und Wilbrandt (1952) sowie Goldacre (1952) diskutieren, erst nach längeren Zeiten auswirken dürften.

Bei p_H 6,75 zeigt die Farbstoffaufnahme in die Vacuole Verhältnisse, die zumindestens qualitativ den beim AO gefundenen Gesetzmäßigkeiten gleichen. Die quantitativen Abweichungen bestehen in dem stetigen Anstieg, den der Speicherungsfaktor σ bei bereits hohen Gesamtaußenkonzentrationen zeigt, ein Befund, der mit gleicher Methodik und gleichem Material in der Zwischenzeit von Murakami (1957) bestätigt werden konnte. Bazin (1944) dagegen erhielt, wie Tabelle 1 zeigt, mit einer colorimetrischen Methode von Collander und Virtanen (1938) einen annähernd $\tilde{c}_a$-unabhängigen Verlauf von σ.

Die Angaben beziehen sich auf die Aufnahme von Neutralrot durch *Chara*-Internodialzellen und eine Färbezeit von 60 min. Vergleicht man die mit gleicher Methodik erhaltenen Werte aus der Arbeit von Collander, Lönegren und Arhimo (1943) mit den Werten der Tabelle 1, so ergeben sich nicht unerhebliche Abweichungen. Für eine Außenkonzentration von $3{,}5 \cdot 10^{-6}$ Mol/Liter fanden Collander und Mitarbeiter nach 60 min Färbezeit einen Speicherungsfaktor $\sigma = 19$.

Das Ergebnis der eigenen Messungen ist in Abb. 10 dargestellt. Ein ähnlicher Verlauf von σ war bereits beim AO, wenn auch dort erst bei sehr viel geringeren Außenkonzentrationen einsetzend, beobachtet worden. Es wird nach den jetzt vorliegenden Messungen am Neutralrot wahrscheinlich, daß die damals erwogene Erklärungsmöglichkeit den Effekt nicht ausschließlich zu deuten vermag. Der beobachtete Anstieg kann zusätzlich mehrere weitere Ursachen haben.

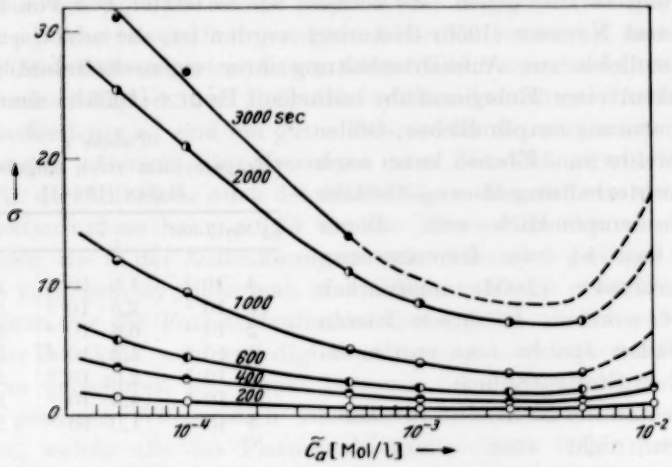


Abb. 10. Speicherungsfaktor σ als Funktion der $\tilde{c}_a$ für verschiedene Zeiten

Die Farbstoffaufnahme verläuft bei geringen Außenkonzentrationen relativ schneller als bei hohen $\tilde{c}_a$. Es wäre dann neben einer rein osmotischen Stoffaufnahme an die Möglichkeit eines zweiten Aufnahmeprozesses begrenzter Kapazität zu denken, etwa nach der Art eines Carrier-Transportmechanismus (ROSENBERG u. WILBRANDT 1952, GOLDACRE 1952, ROSENBERG 1954). Nach voller Auslastung der Transportkapazität wird die auf diese Weise transportierte Stoffmenge vernachlässigbar klein gegen die auf rein osmotischem Wege erfolgende Stoffaufnahme bei hohen Außenkonzentrationen (BOGEN 1956a). Gegen das alleinige Vorliegen eines Transportmechanismus spricht die Tatsache, daß ein $\tilde{c}_a$-abhängiger Gleichgewichtszustand erreicht wird. Als Teilprozeß dagegen könnte sich eine solche nichtosmotische Stoffaufnahme bemerkbar machen. Zwar läßt sich die Frage aus den vorliegenden Meßdaten nicht endgültig entscheiden, doch ergeben sich verschiedene gesetzmäßige Zusammenhänge. Bei der Auswertung wurde folgendermaßen vorgegangen: Um einen Überblick über die Größenordnung der relativ schnelleren Farbstoffaufnahme bei sehr kleinen $\tilde{c}_a$ zu erhalten, wurden die Meßkurven auf sehr kleine Zeiten extrapoliert. Sodann wurde näherungsweise vorausgesetzt, daß bei Annahme einer rein

osmotischen Stoffaufnahme sich eine Permeabilitätskonstante „P" für Zeiten, in denen $\tilde{c}_i$ maximal 20% von $\tilde{c}_a$ beträgt, noch nach der Gleichung

$$\frac{d\,M}{d\,t} = P \cdot A\,(\tilde{c}_a - \tilde{c}_i)$$

berechnen läßt.

Darin bedeuten M die Substanzmenge, die in der Zeit t durch die Zelloberfläche transportiert wird, P die Permeabilitätskonstante, A die Zelloberfläche, $\tilde{c}_a$ die Außenkonzentration und $\tilde{c}_i$ die Konzentration in der Vacuole frei gelöst vorliegenden Farbstoffs. Wie später gezeigt werden wird, besitzt die gesamte Farbstoffaufnahme dieselbe relative Zeitabhängigkeit. Man kann also für den vorgesehenen Zweck einer 0. Näherung den Stoffdurchtritt, wie es ebenfalls später näher begründet wird, als behinderte Diffusion auffassen. Die Rechnung wird zu dem Zweck angestellt, den prozentualen Anteil der metaosmotischen und nichtosmotischen Stoffaufnahme abzuschätzen, weshalb der sonst zu vollem Recht bestehende Einwand, bei einer Beteiligung nichtosmotischer Prozesse könne keine Permeabilitätskonstante berechnet werden, entfällt. Das Ergebnis der Rechnung ist in Tabelle 2 zusammengestellt, die Werte für das Zellvolumen, also für Zellschichtdicke und Zellgrundfläche, wurden einer früheren Arbeit (Bartels 1954) entnommen. Als effektive Zelloberfläche wurde wiederum die doppelte Grundfläche eingesetzt; sie beträgt $2 \times 2{,}27 \cdot 10^{-6}$ cm², die Zellschichtdicke $5 \cdot 10^{-3}$ cm.

Tabelle 2. „*Permeabilitätskonstanten*" *bei* p_H 6,75

$\tilde{c}_a$	$\tilde{c}_i$ 50 sec	$\tilde{c}_i$ 60 sec	$\Delta\,\tilde{c}_i$	$\tilde{c}_i$ 55 sec	$\tilde{c}_a - \tilde{c}_i$	$\frac{\tilde{c}_i \cdot 5 \cdot 10^{-3}}{20\,(\tilde{c}_a - \tilde{c}_i)} = P\frac{\text{cm}}{\text{sec}}$
$5{,}0 \cdot 10^{-5}$	$1{,}00 \cdot 10^{-5}$	$1{,}3 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$1{,}15 \cdot 10^{-5}$	$3{,}85 \cdot 10^{-5}$	$1{,}950 \cdot 10^{-5}$
$1{,}0 \cdot 10^{-4}$	$1{,}70 \cdot 10^{-5}$	$2{,}2 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$1{,}95 \cdot 10^{-5}$	$8{,}05 \cdot 10^{-5}$	$1{,}550 \cdot 10^{-5}$
$5{,}0 \cdot 10^{-4}$	$3{,}80 \cdot 10^{-5}$	$4{,}8 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$4{,}30 \cdot 10^{-5}$	$4{,}57 \cdot 10^{-4}$	$5{,}470 \cdot 10^{-6}$
$1{,}0 \cdot 10^{-3}$	$6{,}50 \cdot 10^{-5}$	$8{,}5 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$7{,}50 \cdot 10^{-5}$	$9{,}25 \cdot 10^{-4}$	$5{,}400 \cdot 10^{-6}$
$2{,}5 \cdot 10^{-3}$	$1{,}20 \cdot 10^{-4}$	$1{,}5 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-5}$	$1{,}35 \cdot 10^{-4}$	$2{,}37 \cdot 10^{-3}$	$3{,}220 \cdot 10^{-6}$
$5{,}0 \cdot 10^{-3}$	$3{,}20 \cdot 10^{-4}$	$4{,}0 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-5}$	$3{,}60 \cdot 10^{-4}$	$4{,}64 \cdot 10^{-3}$	$4{,}310 \cdot 10^{-6}$
$1{,}0 \cdot 10^{-2}$	$1{,}25 \cdot 10^{-3}$	$1{,}6 \cdot 10^{-3}$	$3{,}5 \cdot 10^{-4}$	$1{,}40 \cdot 10^{-3}$	$8{,}60 \cdot 10^{-3}$ bei p_H 9,6	$1{,}035 \cdot 10^{-5}$
$1{,}0 \cdot 10^{-4}$	$1{,}05 \cdot 10^{-5}$	$1{,}75 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-6}$	$1{,}40 \cdot 10^{-5}$	$8{,}60 \cdot 10^{-5}$	$2{,}040 \cdot 10^{-5}$

Collander (Collander, Lönegren und Arhimo 1943) berechnet die mittlere Permeabilitätskonstante des Neutralrots (der Farbbase) für die Aufnahme durch *Chara*-Internodialzellen zu 0,57 cm/Std, was rund $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ cm/sec entspricht.

Die oben errechneten „P"-Werte sind konzentrationsabhängig und zeigen einen Anstieg mit fallender $\tilde{c}_a$. Der erneute Anstieg bei sehr hoher $\tilde{c}_a$ bleibe vorerst außer Betracht, es wird später darauf eingegangen.

Bei sehr geringer $\tilde{c}_a$ wird der Farbstoff also tatsächlich relativ schneller aufgenommen. Der beobachtete Effekt kann einmal mit dem Assoziationsverhalten des Farbstoffs (BARTELS 1956b) zusammenhängen, es kann sich um eine Verarmung an eventuell zur Aufnahme erforderlichen Austauschionen handeln (BOGEN 1956a), um die Erschöpfung der Transportkapazität eines Carriermechanismus, oder aber es kann die das Gleichgewicht bestimmende Innenkonzentration von der Gesamtinnenkonzentration an Farbstoff abhängig sein. Der letztere Fall wäre etwa gegeben, wenn bei einer Beteiligung metaosmotischer Prozesse (BOGEN und PRELL 1953) die Konstante eines Adsorptionsgleichgewichtes durch die hohen Farbstoffkonzentrationen in der Vacuole geändert, und das Gleichgewicht reversibler würde. Das Auftreten eines solchen Vorganges wird schon durch die Tatsache wahrscheinlich, daß eine konstante, festgebundene Farbstoffmenge einen wesentlich steileren Anstieg von σ mit fallender $\tilde{c}_a$ zur Folge haben müßte.

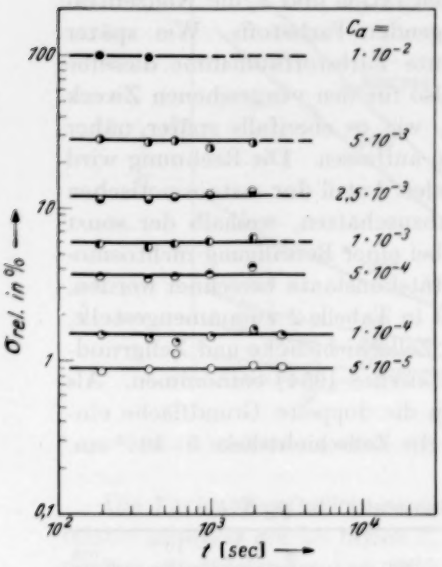


Abb. 11. Verlauf der Werte des relativen Speicherungsfaktors. Abweichungen überall kleiner als 1 %

Handelt es sich bei der nicht rein osmotischen Aufnahme um nichtosmotische Prozesse, so wäre für diese eine andere Zeitabhängigkeit wahrscheinlich. Handelt es sich jedoch um metaosmotische Prozesse, so dürfte keine andere Zeitabhängigkeit festzustellen sein. Es soll daher zunächst versucht werden, ob sich der neben der osmotischen Aufnahme angenommene zweite Aufnahmeprozeß durch eine andere Zeitabhängigkeit nachweisen läßt.

Dazu wurden die relativen Werte des Speicherungsfaktors σ errechnet, die im folgenden als σ_{rel} bezeichnet werden. Das Ergebnis ist in Abb. 11 graphisch dargestellt. Die Werte sind in sehr guter Übereinstimmung nur von der Konzentration, nicht aber von der Zeit abhängig. Daraus könnte man schließen, daß der Aufnahmemechanismus ausschließlich in einer behinderten Diffusion besteht, wobei als Speicherungsmechanismen Lösung in der Vacuole bis zum Erreichen der Außenkonzentration, bei Gültigkeit der Ionenfallentheorie Akkumulation bis zur Konzentrationsgleichheit für die permeationsbefähigten Farbbasenmoleküle, Akkumulation durch reversible Adsorptionsgleichgewichte

bis zum Konzentrationsausgleich des freigelöst vorliegenden Farbstoffs mit der Außenlösung als rein osmotische, Adsorptionsprozesse unter Energieaufwand als metaosmotische Prozesse beteiligt wären. Eine nähere Betrachtung zeigt jedoch, daß weitere Möglichkeiten nicht ausgeschlossen sind. Entweder kann zwar nur ein einziger Aufnahmeprozeß mit $\tilde{c}_a$-abhängiger Geschwindigkeit vorliegen, oder aber es können mehrere Aufnahmeprozesse ablaufen, deren Geschwindigkeit durch einen gemeinsamen zeitbestimmenden Teilprozeß begrenzt und bestimmt wird. Man erhält ferner dieselbe Zeitunabhängigkeit der σ_{rel}-Werte, wenn man mehrere Aufnahmeprozesse ohne gemeinsamen zeitbestimmenden Teilprozeß annimmt, dafür aber voraussetzt, daß sich ihre absoluten Geschwindigkeiten während der gesamten Versuchsdauer entweder nicht, oder aber nur unter Beibehaltung gleicher Relativgeschwindigkeiten ändern. An dieser Stelle muß noch einmal auf das Erreichen eines Gleichgewichtszustandes hingewiesen werden. Für die rein osmotische Aufnahme geht $d\tilde{c}_i/dt \to 0$ für $t \to \infty$. Die gefundene Zeitunabhängigkeit der σ_{rel}-Werte fordert nun, daß auch für die anderen Prozesse eine gleichsinnige Änderung erfolgt. Daraus geht hervor, daß die eventuell an der Farbstoffaufnahme beteiligten nicht rein osmotischen, also die nichtosmotischen bzw. mindestens die metaosmotischen Prozesse nicht völlig unabhängig von den osmotischen Aufnahmeprozessen ablaufen können.

Die gleichartige Zeitabhängigkeit der vermuteten Teilprozesse folgte aus der Zeitunabhängigkeit der σ_{rel}-Werte. Trennt man in osmotische und nichtosmotische Aufnahme, wie es vor allem von Bogen und Follmann (1955) gefordert wird, so kann man zu einer graphischen Darstellung der letzteren kommen. Bei hohen $\tilde{c}_a$ dürfte diese keinen merklichen Beitrag liefern. Die Stoffaufnahme wäre dann im wesentlichen durch die osmotischen Aufnahme- und Speicherungsprozesse bestimmt und folglich auch ihre Zeitabhängigkeit. Bei rein osmotischer Stoffaufnahme müßte $\sigma\ \tilde{c}_a$-unabhängig sein. Es läßt sich also unter Bezug auf einen im Konzentrationsgebiet rein osmotischer Stoffaufnahme ermittelten Speicherungsfaktor, und die dort festgestellte Zeitabhängigkeit eine Kurvenschar errechnen, welche die rein osmotische Stoffaufnahme als Funktion der Zeit und der $\tilde{c}_a$ darstellt. Diese Werte werden von den ihnen entsprechenden gemessenen Werten abgezogen. Trägt man die errechneten Differenzkonzentrationen $\Delta\,\tilde{c}_i$ gegen t auf, so erhält man die Zeitabhängigkeit der Konzentrationszunahme des nichtosmotisch aufgenommenen Farbstoffes, bzw. des osmotisch aufgenommenen und metaosmotisch gespeicherten Farbstoffs. Von $\tilde{c}_a = 1 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter an erweist sich diese Menge als konstant und $\tilde{c}_a$-unabhängig, welche Tatsache allein schon für diesen Farbstoffanteil ein Kriterium für eine nicht rein osmotische Aufnahme bzw.

Speicherung liefert, da es sich um ein echtes Sättigungsphänomen handelt. Bei $\tilde{c}_a = 5 \cdot 10^{-5}$ wäre nach dieser Erklärung die Kapazität des Trägermechanismus oder aber des metaosmotischen Speicherungsmechanismus noch nicht voll erschöpft, die Kurve liegt etwas tiefer (Abb. 12). Es muß jedoch bezweifelt werden, ob die zugrunde gelegten Annahmen berechtigt sind. Erstens erscheint es auffällig, daß rein osmotische und nichtosmotische Stoffaufnahme derselben relativen Zeitabhängigkeit folgen oder aber gewissen Beschränkungen hinsichtlich ihrer Relativgeschwindigkeiten unterworfen sein müßten, wie dies im vorigen Abschnitt diskutiert worden ist. Zweitens aber enthält die aufgestellte Kurve insofern einen Fehler, als bei dem zugrundegelegten Speicherungsfaktor (abgelesen bei $\tilde{c}_a = 2{,}5 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter) der Anteil nichtosmotisch aufgenommenen Farbstoffs vernachlässigt worden war. Die Differenzkonzentration $\Delta\, \tilde{c}_i$ geht also für diese $\tilde{c}_a$ gegen Null. Die abzuziehende Differenzkonzentration kann aus der Zeitabhängigkeit von $\Delta\, \tilde{c}_i$ extrapoliert werden, danach würden metaosmotisch $2 \cdot 10^{-3}$ Mol je Liter gespeichert. Der Speicherungsfaktor kann dann um diesen Wert korrigiert und das ganze Verfahren in 1. Näherung wiederholt werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 graphisch dargestellt, in welcher die Konzentration metaosmotisch gespeicherten Farbstoffs als Funktion der Außenkonzentration in 0. und 1. Näherung aufgetragen ist.

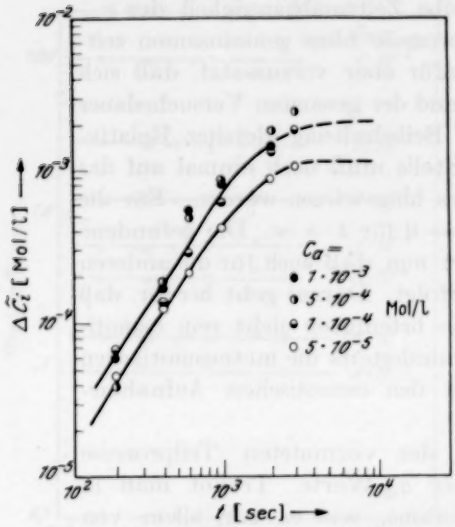


Abb. 12. Zeitliche Zunahme des nicht rein osmotisch gespeicherten Farbstoffs p_H 6,75

Das Vorkommen verschiedener Aufnahmeprozesse läßt sich also nicht durch verschiedene Zeitabhängigkeiten nachweisen. Es ist jedoch festzuhalten, daß der gemessene Anstieg von σ nicht allein durch eine etwa an Membran oder im Plasma fest gebundene Farbstoffmenge erklärt werden kann. Setzt man, wie es in Abb. 14 getan worden ist, verschiedene Werte für diese Menge ein, so ergibt sich, daß der Anstieg sehr viel steiler erfolgen müßte.

Ein Stoffaufnahme- und Speicherungsmechanismus, welcher sowohl den flachen Anstieg von σ, wie auch das Minimum der Differenzkonzentration $\Delta\, \tilde{c}_i$ bei hohen $\tilde{c}_a$ und den ihnen entsprechenden hohen $\tilde{c}_i$ erklärt, ist folgender: Die Gesamtfarbstoffaufnahme und -speicherung setzt sich aus zwei Prozessen zusammen. Es ist dies einmal ein ideal reversibles

Gleichgewicht; dieser Anteil der Stoffaufnahme und -speicherung möge rein osmotischer Natur sein. Daneben wird ein zweites, weniger leicht reversibles Gleichgewicht angenommen, das für geringe $\tilde{c}_i$ praktisch irreversibel ist, mit steigender $\tilde{c}_i$ aber infolge einer Stoffwechselbeeinflussung erst immer reversibler wird und schließlich nur noch einen vernachlässigbar kleinen Anteil zur Speicherung liefert. Diese Vorstellung läuft praktisch auf die Annahme einer Beteiligung metaosmotischer Prozesse hinaus, sie steht ferner in Einklang mit der gleichartigen Zeitabhängigkeit der beiden Teilprozesse.

Es verbleibt noch die Notwendigkeit, auf den starken Anstieg von σ bei $\tilde{c}_a > 5 \cdot 10^{-3}$ einzugehen. Eine irgendwie gestützte Aussage kann über den Effekt nicht gemacht werden. Folgende Möglichkeiten erscheinen denkbar: Es kann sich einmal um eine Vergiftungserscheinung handeln oder aber, welcher Möglichkeit die größere Wahrscheinlichkeit zukommt, um den Einfluß der bei diesen hohen Innenkonzentrationen schon stark vertretenen Tetrameren.

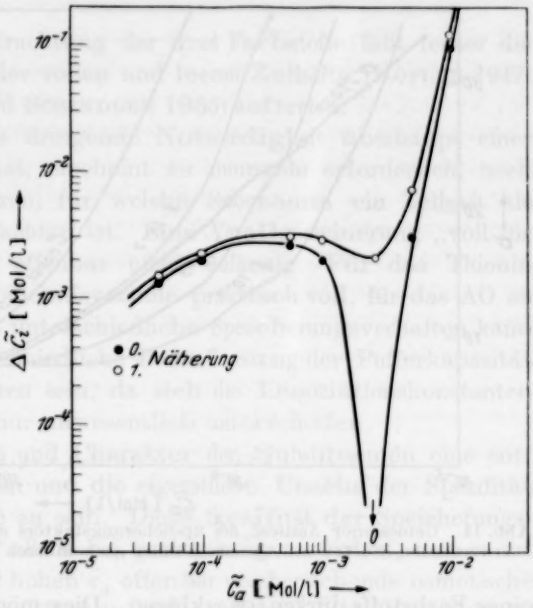


Abb. 13. Näherungsverfahren zur Ermittlung der Menge nicht rein osmotisch gespeicherten Farbstoffs

Nachdem nun für drei basische Farbstoffe quantitative mikrospektrographische Messungen zur Aufnahme und Speicherung vorliegen, erscheint ein Versuch einer vergleichenden Betrachtung in theoretischer Hinsicht berechtigt. Alle drei Farbstoffe werden bevorzugt im alkalischen Milieu aufgenommen und gespeichert, eine darüberhinausgehende, allgemeingültige Theorie, welche sowohl p_H- als auch Konzentrationsabhängigkeit der Speicherung erklärt, läßt sich jedoch nicht erkennen.

Die Speicherung der drei Farbstoffe scheint in starkem Maße von der Art der Substitution beeinflußt zu sein, wobei sich eine Reihe vom 3,6-dimethylamino-substituierten Acridinorange über das 3-amino-6-dimethylamino-substituierte Neutralrot bis zum 3,6-diamino-substituierten Thionin erkennen läßt. Der Einfluß der Substitution wird vor allem von Bazin (1946) herausgestellt. Er betrifft in erster Linie

die Aufnahmegeschwindigkeit. NH_2-Gruppen begünstigen das Eindringen. So dringt das Diaminophenazin schneller ein als das Neutralrot, das Bismarckbraun mit seinen vier Aminogruppen schneller als das bis-amino-substituierte Chrysoidin. Auch das Diamin Nilblau dringt schneller ein als sein entsprechendes Monoamin.

Auf das Verhalten eines jeden der drei obenerwähnten Farbstoffe treffen Voraussagen der verschiedensten Theorien zu, keine der bestehenden Theorien kann jedoch das gesamte Speicherungsverhalten

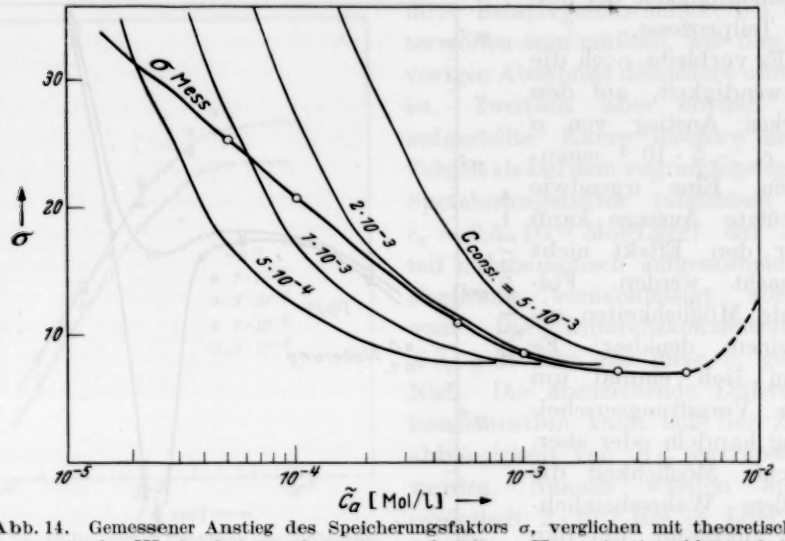


Abb. 14. Gemessener Anstieg des Speicherungsfaktors σ, verglichen mit theoretisch zu erwartenden Werten bei Annahme einer „scheinbaren Konzentrationsabhängigkeit"

eines Farbstoffs lückenlos erklären. Dies möge am Beispiel der Ionenfallentheorie (HÖFLER 1947, KINZEL 1954) erläutert werden.

Das Thionin, wie auch das Neutralrot-Basenmolekül folgen hinsichtlich der p_H-Abhängigkeit ihrer Aufnahme und Speicherung streng den Dissoziationskurven, ein Verhalten, das genau den Voraussagen der Ionenfallentheorie entspricht. Die $\tilde{c}_a$-Abhängigkeit der Speicherung dieser beiden Farbstoffe ist dagegen nicht unmittelbar nach der Ionenfallentheorie zu verstehen. Beim Acridinorange dagegen findet man eine streng eingehaltene Abhängigkeit der Innenkonzentration von der Außenkonzentration, wie es nach der Ionenfallentheorie zu erwarten ist[1], aber gerade bei diesem Farbstoff besteht keine Beziehung zwischen p_H-Abhängigkeit der Aufnahme und Dissoziationskurve.

Setzt man die strenge Gültigkeit der Ionenfallentheorie voraus, so wird die Stufe bei der p_H-Abhängigkeit der NR-Aufnahme schwer zu

[1] Eine gegenteilige Schlußfolgerung von BARTELS (1954) läßt sich nicht aufrechterhalten.

verstehen sein. Es würde jedoch der Ionenfallenmechanismus in seinem Prinzip zu denselben Auswirkungen führen, wenn die Theorie keine absolute Undurchlässigkeit der Plasmagrenzschichten für Kationen postulieren, sondern lediglich für letztere einen höheren Diffusionswiderstand verlangen würde. Die vorliegenden Messungen zeigen eigentlich, daß dies tatsächlich so ist, außerdem würden sich die Ansichten DRAWERTS (1948) bestätigt finden, nach denen sich basische Farbstoffe beim Vorliegen eines c_H-Gradienten auf der sauereren Seite eines Systems anreichern.

Die vergleichende Betrachtung der drei Farbstoffe läßt ferner die Frage nach dem Begriff der vollen und leeren Zellsäfte (HÖFLER 1947, KINZEL 1954, HÖFLER und SCHINDLER 1955) auftreten.

Nachdem HÖFLER die dringende Notwendigkeit überhaupt einer Unterscheidung betont hat, erscheint es nunmehr erforderlich, noch eingehender zu spezifizieren, für welche Substanzen ein Zellsaft als voll bzw. als leer zu betrachten ist. Eine Verallgemeinerung „voll für basische Farbstoffe" ist offenbar nicht zulässig. Für das Thionin scheint die *Allium*-Oberepidermisvacuole praktisch voll, für das AO so gut wie leer zu sein. Das unterschiedliche Speicherungsverhalten kann auch nicht auf eine unterschiedliche Beeinflussung der Pufferkapazität der Vacuole zurückzuführen sein, da sich die Dissoziationskonstanten dieser beiden Farbstoffe nur unwesentlich unterscheiden.

Dagegen scheinen Art und Charakter der Substituenten eine entscheidende Rolle zu spielen und die eigentliche Ursache der Spezifität der Speicherungsvorgänge zu sein. Diese Spezifität der Speicherungsvorgänge dürfte sich vor allem bei geringen $\tilde{c}_a$ auswirken, und es ist wohl möglich, daß die bei hohen $\tilde{c}_a$ offenbar vorherrschende osmotische Aufnahme und Speicherung (BOGEN 1956a) bereits Folge einer Schädigung ist, mit welcher Feststellung jedoch eine voll vitale osmotische Aufnahme und Speicherung bei geringen $\tilde{c}_a$ keineswegs verneint werden soll. Diese Vorstellung entspricht der Auffassung STEINBACHS (1951), welcher fordert, daß zuerst der Nachweis einer nichtosmotischen Stoffaufnahme geführt werden müsse, bevor eine Beteiligung osmotischer Prozesse gänzlich geleugnet wird (OVERSTREET und JACOBSON 1952).

Die beobachteten spezifischen Eigenschaften der Speicherung in der Vacuole auf sterische Gründe zurückzuführen, erscheint zu gewagt. Da sich die Spezifität im wesentlichen im Speicherungsfaktor ausdrückt, ist vielmehr der Gedanke an eine Stoffwechselempfindlichkeit eines Teiles der Speicherungsprozesse naheliegend. BOGEN (1956b) nimmt eine Adsorption an labile Glycoproteide an. Nun braucht keineswegs lediglich der Speicherungsmechanismus, also im eben erwähnten Falle etwa die Struktur der Glycoproteide, stoffwechselempfindlich zu sein, sondern diese Empfindlichkeit kann ebenso bereits den Aufnahmeprozeß

betreffen. Die Messungen am Acridinorange und am Neutralrot ergeben Parallelen zu den Verhältnissen, wie sie von REICHENBERG und SUTCLIFFE (1954) diskutiert worden sind. Auch ein Mechanismus, wie er von REICHENBERG und SUTCLIFFE (1954) angenommen wird, bestätigt die Aussagen DRAWERTS (1948) über die Anreicherung basischer Farbstoffe auf der saureren Seite eines Systems mit einem c_H-Gradienten.

Die p_H-Abhängigkeit der NR-Aufnahme läßt sich gut als behinderte Diffusion verstehen. Beim Übergang von p_H 9,6 zu p_H 6,75 wird nicht die Lage des Gleichgewichts, sondern lediglich seine zeitliche Einstellung verschoben. Bei p_H 6,75 wird also nicht, wie es nach Abb. 5 den Anschein haben könnte, weniger gespeichert, sondern nach 15 min ist bei p_H 6,75 der Endzustand noch nicht erreicht. Dieser Befund steht durchaus im Einklang mit den Voraussagen der Ionenfallentheorie, der ja primär ein osmotischer Aufnahmeprozeß zugrunde liegt. Wie oben bereits besprochen, bleibt das Prinzip der Ionenfalle auch erhalten, wenn Kationen permeieren können (KÖLBEL 1948, AXMACHER und NARATH 1934, WILBRANDT 1938), sofern dieser Vorgang hinreichend langsam gegen die Permeation der Basenmoleküle erfolgt. Die Ionenfallentheorie allein kann jedoch auch nicht zutreffen, dem widerspricht die fehlende Invarianz der Permeabilitätskonstanten gegen die Außenkonzentration, wie sie für einen rein osmotischen Speicherungsprozeß zu fordern wäre. Da die gesamte Farbstoffaufnahme ein und derselben relativen Zeitabhängigkeit folgt, erscheint es plausibel, nur einen Aufnahmeprozeß anzunehmen und die Spezifität der Aufnahme- und Speicherungsbedingungen für die drei genannten Farbstoffe in einer Beeinflussung der Speicherungsmechanismen zu sehen. Auch BÜNNING (1936) sieht die Ursache für eine Aufnahmeänderung in einer Änderung der Speicherungsmöglichkeiten. Welcher Art der Durchtrittsmechanismus ist, kann aus den vorliegenden Messungen nicht endgültig entschieden werden. Geht man jedoch davon aus, daß bei hohen $\tilde{c}_a$ zweifellos eine behinderte Diffusion, also ein osmotischer Prozeß, das Geschehen bestimmt, und daß man genau dieselbe relative Zeitabhängigkeit auch bei sehr geringen c_a findet, so könnte man den Schluß ziehen, daß die gesamte Farbstoffaufnahme eine behinderte Diffusion ist. Prozesse, wie sie von ROSENBERG und WILBRANDT (1952), sowie von GOLDACRE (1952) diskutiert worden sind, können entweder keinen merklichen Beitrag liefern, oder aber die Geschwindigkeit des Transportes durch Enzymkomplexe bzw. durch Adsorption und Desorption an Proteine variablen Faltungsgrades müßten in genau einzuhaltenden relativen Geschwindigkeitsverhältnissen zu den Diffusionsprozessen stehen.

Faßt man die hier angestellten Überlegungen zusammen, kommt man zu folgenden Schlußfolgerungen. Die Farbstoffaufnahme des Neutralrots erfolgt wahrscheinlich durch eine behinderte Diffusion. Der

Speicherungsmechanismus besteht einmal darin, daß eine Art Ionenfallenmechanismus auftritt, wobei jedoch auch Kationen zu permeieren vermögen. Die Fallenwirkung kommt dadurch zustande, daß die Farbbasenmoleküle schneller zu permeieren vermögen als die Kationen. Ein Teil des Speicherungsprozesses dürfte metaosmotischer Natur sein, da Sättigungsphänomene auftreten. Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß mit steigender Innenkonzentration dieser Teil der Speicherungsmöglichkeiten infolge Vergiftung ausscheidet und sein Gleichgewicht beliebig reversibel wird. Die Spezifität der Speicherungsprozesse für die drei basischen Farbstoffe Acridinorange, Thionin und Neutralrot wird darin gesehen, daß die Stoffwechselprozesse, welche die Energie für den metaosmotischen Anteil der Speicherung liefern, von den genannten Substanzen in verschiedener Art und Weise gestört werden.

Schlußbemerkungen

Die direkte mikrospektrographische Messung von Substanzkonzentrationen in den Vacuolen einzelner lebender Zellen vermag bei Verwendung eines hinreichend großen statistischen Materials äußerst zuverlässige Werte zu liefern. Sie ist daher für die Untersuchung der Aufnahme- und Speicherungsbedingungen vieler Substanzen geeignet. Gegenüber der subjektiven Beobachtung der Aufnahme von Farbstoffen bietet sie den Vorteil, direkt vergleichbare Werte zu liefern, eine wesentlich höhere Unterschiedsempfindlichkeit zu besitzen und quantitative Zusammenhänge sichtbar werden zu lassen. Die hier vorgelegten Meßdaten dürfen als gesichert betrachtet werden. Ihre Ausdeutung stellt im Gegensatz dazu ein subjektives Element dar und kann für ihre Richtigkeit nur eine gewisse Wahrscheinlichkeit in Anspruch nehmen. Die oben erwähnten Vorteile der objektiven Meßmethode lassen feinere Einzelheiten hervortreten, welche bei der theoretischen Ausdeutung berücksichtigt werden müssen. Die sich ergebenden wesentlich komplizierteren Verhältnisse machen es eindeutig klar, daß sogar bei der Aufnahme von Substanzen weitgehend ähnlichen physikalisch-chemischen Verhaltens, wie beispielsweise der drei basischen Farbstoffe Acridinorange, Thionin und Neutralrot, gemeinsame Gesetzmäßigkeiten nur sehr allgemeiner Natur zu finden sind. Es erscheint dies nicht erstaunlich, wenn man bedenkt, daß die resultierende Gesamtfarbstoffaufnahme sich aus sehr vielen möglichen, und zweifellos auch nebeneinander herlaufenden Einzelprozessen ergibt. Das Neutralrot beispielsweise liegt bei p_H 6,75 nicht nur als Kation NR^+_I, als Kation NR^+_{II} und zu einem gewissen kleinen Prozentsatz als ungeladenes Basenmolekül NR vor, sondern daneben existieren in Abhängigkeit von der Konzentration Monomere, Dimere und Tetramere. Einfache Zusammenhänge sind bei einer solch komplexen Natur des Gesamtvorganges nicht zu erwarten.

Zusammenfassung

Aufnahme und Speicherung des basischen Phenazinfarbstoffes Neutralrot werden in Abhängigkeit von Färbezeit, Konzentration und p_H-Wert der Außenlösung quantitativ gemessen. Bei p_H 6,75 stellen sich nach etwa 3000 sec außenkonzentrationsabhängige Gleichgewichtskonzentrationen in der Vacuole ein, bei p_H 9,6 wird derselbe Endzustand nach bereits etwa 1000 sec erreicht. Der Speicherungsfaktor σ zeigt einen bereits bei hohen Außenkonzentrationen beginnenden stetigen Anstieg mit fallender Außenkonzentration. Die Beteiligung metaosmotischer und nichtosmotischer Stoffaufnahme- und Speicherungsvorgänge wird diskutiert. Der konzentrationsabhängige, relative Verlauf des Speicherungsfaktors σ ist jedoch zeitunabhängig, so daß bei einer Annahme metaosmotischer und nichtosmotischer zusätzlicher Aufnahme- und Speicherungsprozesse gewisse Einschränkungen hinsichtlich ihrer möglichen Zeitabhängigkeiten beachtet werden müßten.

Dem Direktor des Botanischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen, Herrn Professor Dr. D. v. DENFFER, möchten wir für die gewährte freundliche Unterstützung aufrichtig danken. Gleichzeitig gilt unser Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Meßgeräten.

Literatur

AXMACHER, FR., u. H. NARATH: Die Beeinflussung von Zell- und Organfunktionen durch organische Farbstoffe. VI. Weitere Beiträge zum Mechanismus der Farbstoffaufnahme durch Hefezellen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **175**, 293—306 (1934). — BARTELS, P.: Quantitative mikrospektroskopische Untersuchung der Speicherungs- und Permeabilitätsverhältnisse akridinorangegefärbter Zellen. Planta (Berl.) **44**, 341—369 (1954). — Spektralphotometrische Untersuchung am Neutralrot. I. Prototropiegleichgewichte und Normaltemperaturspektren im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich. Z. physik. Chem., N. F. **9**, 74—94 (1956a). — Spektralphotometrische Untersuchungen am Neutralrot. II. Das Assoziationsverhalten in wäßriger Lösung. Z. physik. Chem., N. F. **9**, 95—105 (1956b). — BARTELS, P., u. H. O. SCHWANTES: Quantitative mikrospektrographische Messungen zur Aufnahme von Thionin durch lebende Zellen von *Allium Cepa*. Z. Naturforsch. **10** b, 712—720 (1955). — BAZIN, S.: Action de différents sels de colorants basiques sur les cellules d'*Elodea canadensis*. C. r. Soc. Biol. Paris **138**, 79—80 (1944). — Influence de la constitution chimique de divers colorants sur leur pénétration dans la cellule vivante de *Chara*. C. r. Soc. Biol. Paris **140**, 210—211 (1946). — BETHE, A.: Der Stoffaustausch zwischen Zellen und Umgebung vom Standpunkt der Ladungshypothese und der Austauschadsorption. Naturwiss. **37**, 177—182 (1950). — BETZ, A.: Untersuchungen über Verhalten und Wirkung der Vitalfarbstoffe Prune pure und Akridinorange sowie Beobachtungen über das Reduktions-Oxydationspotential in Zellen höherer Pflanzen. Planta (Berl.) **41**, 323—357 (1953). — BOGEN, H. J.: Untersuchungen über den Quellungseffekt permeierender Anelektrolyte. I. Ionenwirkung auf die Permeabilität von *Rhoeo discolor*. Z. Bot. **36**, 65—106 (1940). — Untersuchungen über den Quellungseffekt permeierender Anelektrolyte. II. Ionenwirkung auf die Permeabilität von *Gentiana cruciata*. Planta (Berl.) **32**, 150—175 (1941). — Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. II, S. 116. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer

(1956a). — Nichtosmotische Aufnahme von Wasser und gelösten Anelektrolyten. Ber. dtsch. bot. Ges. **69**, 209—222 (1956b). — BOGEN, H. J., u. G. FOLLMANN: Osmotische und nichtosmotische Stoffaufnahme bei Diatomeen. Planta (Berl.) **45**, 125—146 (1955). — BOGEN, H. J., u. H. PRELL: Messung nichtosmotischer Wasseraufnahme an plasmolysierten Protoplasten. Planta (Berl.) **41**, 459—479 (1953). — BÜNNING, E.: Über die Farbstoff- und Nitrataufnahme bei *Aspergillus niger*. Flora (Jena) **131**, 86—112 (1936). — CZAJA, A.: Untersuchungen über den Membraneffekt des Absorptionsgewebes und über die Farbstoffaufnahme in die lebende Zelle. Planta (Berl.) **26**, 90—119 (1937). — COLLANDER, R., H. LÖNEGREN u. E. ARHIMO: Das Permeationsvermögen eines basischen Farbstoffes mit demjenigen einiger Anelektrolyte verglichen. Protoplasma (Berl.) **37**, 527—537 (1943).— COLLANDER, R., u. E. VIRTANEN: Die Undurchlässigkeit pflanzlicher Protoplasten für Sulfosäurefarbstoffe. Protoplasma (Berl.) **31**, 499—507 (1938). — DRAWERT, H.: Der Einfluß anorganischer Salze auf die Aufnahme und Abgabe von Farbstoffen durch die pflanzliche Zelle. Ber. dtsch. bot. Ges. **55**, 380—390 (1937). — Beiträge zur Entstehung der Vakuolenkontraktion nach Vitalfärbung mit Neutralrot. Ber. dtsch. bot. Ges. **56**, 123—131 (1938). — Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora (Jena) **134**, 159—214 (1940). — Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. V. Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. Z. Naturforsch. **3b**, 111—120 (1948). — Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Janusgrün, Nilblausulfat und Berberinsulfat. Ber. dtsch. bot. Ges. **66**, 135 bis 151 (1953). — Vitalfärbung der Plastiden von *Allium Cepa* mit Coelestinblau. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 33—42 (1954). — GOLDACRE, R. J.: The folding and unfolding of protein molecules as a basis of osmotic work. Internat. Rev. Cytology **1**, 135 bis 164 (1952). — GUILLIERMOND, A.: Sur la présence de lipides (phospholipides et stéroides) dans les vacuoles de certaines cellules végétales. Protoplasma (Berl.) **27**, 290—307 (1937). — GUILLIERMOND, A., et F. OBATON: Sur l'action de p_H du milieu dans la coloration vitale des cellules végétales. C. r. Soc. Biol. Paris **116**, 984—988 (1934). — GUTSTEIN, M.: Farbstoffspeicherung durch lebende Bakterien. Zbl. Bakter. I Orig. **105**, 478—480 (1932). — HAAN, J. DE: Ionenwirkung und Wasserpermeabilität. Ein Beitrag zur Koazervattheorie der Plasmagrenzschichten. Protoplasma (Berl.) **24**, 188—197 (1935). — HÖFLER, K.: Über den isoelektrischen Punkt natürlicher Zellulosemembranen und deren Färbbarkeit mit Fluorochromen. Anz. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturwiss. Kl. **1946**, Nr 7, 41—48. — Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Permeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie (Wien) **2**, 13—29 (1947). — HÖFLER, K., u. H. SCHINDLER: Volle und leere Zellsäfte bei Algen. Protoplasma (Wien) **45**, 173—193 (1955). — IRWIN, M.: The permeability of living cells to dyes as affected by hydrogen ion concentration. J. Gen. Physiol. **5**, 223—224 (1923). — KIERMAYER, O.: Über die Reduktion basischer Vitalfarbstoffe in pflanzlichen Vakuolen. Sitzgsber. österr. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturwiss. Kl., Abt. I **164**, 275—302 (1955). — KINZEL, H.: Die Bedeutung der Pektin- und Zellulosekomponente für die Lage des Entladungspunktes pflanzlicher Zellwände. Protoplasma (Wien) **42**, 208—226 (1953). — Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Farbstoffe in leeren Zellsäften. Protoplasma (Wien) **44**, 52—72 (1954). — KÖLBEL, H.: Quantitative Untersuchungen über den Speicherungsmechanismus von Rhodamin B, Eosin und Neutralrot in Hefezellen. Z. Naturforsch. **3 b**, 442—453 (1948). — KREUZ, J.: Der Einfluß von Calcium- und Kaliumsalzen auf die Permeabilität des Protoplasmas für Harnstoff und Glycerin. Österr. bot. Z. **90**, 1—30 (1941). — KÜSTER, E. (1898): Zit. nach E. KÜSTER, Über die Vitalfärbung der Pflanzenzellen. Forschgn u. Fortschr. **18**, 292—295 (1942). — MCCUTCHEON, M., and B. LUCKÉ: The mechanism of vital staining with basic dyes. J. Gen. Physiol. **6**, 501—507 (1924). —

Murakami, S.: Briefl. Mitt. Bot. Inst. Fac. of Sci. Tokyo Univ. Bunkyo-ku Tokyo 1957. — Neuber, E.: Zit. nach H. J. Bogen, Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. II, S. 230. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956. — Osterhout, W. J. V.: Permeability in large plant cells and in models. Erg. Physiol. **35**, 967—1021 (1933). — Overstreet, R., and L. Jacobson: Mechanism of ion absorption by roots. Annual Rev. Plant Physiol. **3**, 189—206 (1952). — Perner, E. S.: Die intravitale Aufnahme und Speicherung sulfosaurer Fluorochrome durch die obere Zwiebelschuppenepidermis von *Allium Cepa*. Protoplasma (Wien) **39**, 180—205 (1950). — Reichenberg, D., and J. F. Sutcliffe: Absorption of ions by plants. Nature (Lond.) **174**, 1047—1048 (1954). — Rosenberg, Th.: On accumulation and active transport in biological systems. I. Thermodynamic considerations. Acta chem. scand. (Copenh.) **2**, 14—33 (1948). — The concept and definition of active transport. Symposia Soc. Exper. Biol. **8**, 27—41 (1954). — Rosenberg, Th., and W. Wilbrandt: Enzymatic processes in cell membrane penetration. Internat. Rev. Cytology **1**, 65—92 (1952). — Ruhland, W.: Die Bedeutung der Kolloidnatur wäßriger Farbstofflösungen für ihr Eindringen in lebende Zellen. Ber. dtsch. bot. Ges. **26a**, 772—782 (1908). — Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. Jb. wiss. Bot. **51**, 376—431 (1912). — Scarth, G. W.: The mechanism of accumulation of dyes by living cells. Plant Physiol. **1**, 215—229 (1926). — Steinbach, H. B.: Permeability. Annual Rev. Plant Physiol. **2**, 323—342 (1951). — Strugger, S.: Beiträge zur Gewebsphysiologie der Wurzel. Zur Analyse und Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma (Berl.) **24**, 108—127 (1935). — Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma (Berl.) **26**, 56—63 (1936). — Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma (Berl.) **34**, 601—608 (1940). — Wiede, M., u. F. Meyer: Über die Toxizität einiger Fluorochrome. Protoplasma (Wien) **44**, 342—349 (1955). — Wilbrandt, W.: Die Permeabilität der Zelle. Erg. Physiol.. **40**, 204—291 (1938).

Dr. Peter Bartels, Dr. H.-O. Schwantes, Gießen,
Botan. Inst. d. Justus-Liebig-Universität, Bismarckstr. 16

Planta, Bd. 50, S. 25—40 (1957)

Aus der Abteilung Botanik der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

DIE REGULATION DES WURZELWACHSTUMS DURCH SYNTHETISCHE UND ENDOGENE INHIBITOREN

Von
EIKE LIBBERT

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 3. Juni 1957)

Einleitung

In letzter Zeit wurde verschiedentlich die Möglichkeit erwogen, daß das Wurzelwachstum nicht oder nicht allein vom Auxin geregelt würde, sondern daß an der Regulation ein endogener Inhibitor beteiligt sei. Diese Arbeit verfolgt den Zweck, die Beteiligung endogener Inhibitoren an der Regulation des Wurzelwachstums zu beweisen.

AUDUS (1954) sowie AUDUS und SHIPTON (1952) vermuteten, daß ein endogener Inhibitor der unmittelbare Regulator des Wurzelwachstums sei. BURSTRÖM (1954) fand, daß ein unbekannter hemmender „Faktor X" die zweite Phase der Streckung von Wurzelzellen begrenze. STREET (1954, 1955) sprach von einem Faktor, der sich während des Wachstums zu hemmender Konzentration in der Wurzel anreichere.

Alle Hinweise auf die Beteiligung endogener Inhibitoren waren indirekter Art. LIBBERT (1955c) konnte aus Erbsenpflanzen spezifische Hemmstoffe extrahieren, die unter Auxineinwirkung ineinander umgelagert werden können. Da einer der beiden Hemmstoffe in der Wurzel entsteht (LIBBERT 1954, 1955a, c), kann man an eine Bedeutung dieses Hemmstoffsystems für das Wurzelwachstum denken. Deshalb sollten die Hemmstoffextrakte am Wurzelwachstum getestet werden, sowohl allein als auch kombiniert mit Auxin bzw. mit mutmaßlichen Antiauxinen.

Antiauxine: Substanzen, die die Auxinwirkung kompetitiv hemmen (TUKEY u. a. 1954). — Auxinantagonisten: Substanzen, die eine der Auxinwirkung entgegengerichtete Wirkung dadurch entfalten, daß sie auf beliebige Weise in das Auxinsystem oder den Auxinstoffwechsel eingreifen; das braucht nicht notwendigerweise kompetitiv zu sein. — Abkürzungen: IES = Indol-3-essigsäure; NMSP = α-(1-Naphthylmethylsulfid)-propionsäure; PCIB = α-4-Cl-Phenoxyisobuttersäure; HS = Hemmstoffextrakt aus *Pisum*-Wurzeln (vgl. Text).

Dieser Absicht liegt die Voraussetzung zugrunde, daß Auxin an der Regulation des Wurzelwachstums beteiligt sei. Das ist nicht unwiderlegbar bewiesen, aber sehr wahrscheinlich: Einerseits beeinflußt IES in sehr geringer Konzentration das Wurzelwachstum; andererseits konnte verschiedentlich IES in Wurzeln nachgewiesen werden. — In

geringer Konzentration fördert Auxin (IES) das Wurzelwachstum. Das ist am deutlichsten bei Wurzelsegmenten oder isolierten Wurzelspitzen (AUDUS und DAS 1955, AUDUS und THRESH 1953, BALDOVINOS DE LA PENA 1949, KEFFORD 1955, LEOPOLD und GUERNSEY 1954, LEOPOLD und KLEIN 1952, diese Arbeit u. v. a.); denn diese Objekte enthalten weniger endogenes Auxin als intakte Wurzeln.

In höheren Konzentrationen hemmt Auxin das Wurzelwachstum. Diese Hemmung dürfte eine Wirkung erster Ordnung sein und nicht durch überoptimale Auxinkonzentration am selben Reaktionsort zustande kommen wie die Förderung durch Auxin. Dafür gibt es theoretische und experimentelle Hinweise: POHL und OCHS (1953) und OCHS (1954) konnten die durch IES bewirkten Förderungen im Gegensatz zu den Hemmungen aufheben durch KCN, Indol oder Tryptophan. Umgekehrt ließen sich die durch IES erzielten Hemmungen, aber nicht die Förderungen, aufheben durch Jodazetat. — Weitere Hinweise geben Versuche mit mutmaßlichen Antiauxinen wie PCIB und NMSP. Die Förderung intakter Wurzeln durch diese Substanzen wird allgemein als kompetitive Verdrängung des Auxins von seinem Reaktionsort erklärt (z. B. ÅBERG 1952). Hemmungen, die durch überoptimale Auxinkonzentrationen hervorgerufen werden (z. B. die Hemmung des Coleoptilwachstums durch hohe Auxinkonzentrationen), werden aber nicht durch Antiauxine (LINSER 1954) und speziell nicht durch PCIB (FOSTER u. a. 1955) antagonisiert. Das ist nach den theoretischen Vorstellungen auch nicht zu erwarten. — Jede Erklärung der Förderungen durch Antiauxine, die auf kompetitiver Interferenz mit überoptimalen Auxinkonzentrationen beruht, versagt an solchen Objekten, die sowohl durch Auxin gefördert werden als auch durch Antiauxin. Als derartige Objekte wurden aber Erbsen-Wurzelsegmente (AUDUS 1954, AUDUS und DAS 1955) sowie intakte Wurzeln einiger Maissorten (PORTER 1953) erkannt.— Diese Ergebnisse führen alternativ zu 2 Folgerungen: Entweder man leugnet, daß die Förderungen des Wurzelwachstums durch Substanzen wie PCIB und NMSP auf deren Antiauxineigenschaft beruhen (AUDUS u. Mitarb., l. c.); oder man folgert, daß der Förderung und der Hemmung des Wurzelwachstums durch Auxin 2 verschiedene Primärreaktionen zugrunde liegen (zu einer ähnlichen Folgerung kommt PORTER). — Möglicherweise erfolgen 2 primär verschiedene Auxinwirkungen in der Einzelzelle nicht gleichzeitig, sondern in zeitlicher Aufeinanderfolge: BURSTRÖM (1942, 1957) unterscheidet 2 Phasen des Wurzelwachstums. In der 1. Phase fördert Auxin, in der 2. (der Hauptstreckungsphase) hemmt es. —

Wie erwähnt, soll in dieser Arbeit gezeigt werden, daß bestimmte endogene Inhibitoren in das Wurzelwachstum eingreifen. In der neutralen Phase ätherischer Extrakte aus *Pisum*-Wurzeln kommen

2 Inhibitoren vor (LIBBERT 1955c). Sie wurden zunächst als „Hemmstoffvorstufe" und „Korrelationshemmstoff" bezeichnet, später aus bestimmten Gründen umbenannt in „Hemmstoff A" und „Hemmstoff B" (LIBBERT 1957). Hemmstoff A entsteht in der Wurzel (LIBBERT 1954, 1955a, c). Durch Auxin wird eine Umwandlung von Hemmstoff A in Hemmstoff B erreicht (HÖPFNER, LIBBERT 1955b, c). Diese Umwandlung ist wahrscheinlich eine chemische Reaktion zwischen Hemmstoff A und IES (LIBBERT 1955d); das Reaktionsprodukt ist der Hemmstoff B. Hemmstoff B wäre demnach gleichzusetzen mit Auxin, das an einen spezifischen Partner gebunden ist.

Dieses spezifisch gebundene Auxin (Hemmstoff B) wird (Arbeitshypothese) als ein Regulator des Wurzelwachstums vermutet. Auxin kann demnach auf das Wurzelwachstum eine doppelte Wirkung ausüben: 1. wirkt es in freier Form (Förderung); 2. wirkt es (über die Hemmstoffumwandlung) in spezifisch gebundener Form als Hemmstoff B (Hemmung). Ob das freie Auxin und der Hemmstoff B am selben Wachstumszentrum angreifen, oder ob 2 verschiedene Reaktionsorte angenommen werden müssen, soll zunächst dahingestellt bleiben. Im letzteren Falle könnten die beiden Auxinwirkungen evtl. identifiziert werden mit BURSTRÖMs (1942) 2 Phasen des Wurzelwachstums: In der 1. Phase fördert das freie Auxin, in der 2. Phase hemmt Auxin dadurch, daß es mit einem spezifischen Inhibitor (Hemmstoff A) zusammenwirkt. Man vergleiche dazu, daß nach Ansicht BURSTRÖMs (1954) ein hemmender „Faktor X" die 2. Phase des Wurzelwachstums begrenze.

Methode

Objekte waren intakte Keimwurzeln von *Lepidium sativum*, *Linum usitatissimum* und *Triticum aestivum* (Sorte Peko) sowie Wurzelsegmente und dekapitierte Keimwurzeln von *Linum* und *Triticum*. Die mit intakten Wurzeln angewendete Methode war nach dem Kressewurzeltest (MOEWUS 1949) variiert. — Die Anzucht erfolgte in Petrischalen. *Lepidium* und *Triticum* wurden auf Filterpapier gekeimt, *Linum* auf Kristallquarzsand. *Triticum*-Karyopsen wurden vor Auslegen in die Keimschalen in gequollenem Zustand etwa 3 Tage bei $+2$ bis $+4^0$ C aufbewahrt; dadurch wurden Geschwindigkeit und Gleichmäßigkeit der Keimung erhöht. Die Anzucht geschah im Dunkeln in Brutschränken bei $+27^0$ (*Lepidium* und *Triticum*) bzw. bei $+21^0$ C (*Linum*).

Für jeden Versuch mit intakten oder dekapitierten Wurzeln wurden Keimlinge mit gerade gewachsenen Wurzeln einer konstanten Ausgangslänge verwendet. Diese betrug 5, 6 oder 7 ($\pm 0{,}5$) mm. Bei Versuchen mit dekapitierten Wurzeln war die Dekapitationsweite 1 mm. Für die Versuche mit Wurzelsegmenten wurden gerade gewachsene Wurzeln mit einer Ausgangslänge von 10 (± 2) mm verwendet. Aus diesen wurde mit einem Schneidegerät je ein Segment von 5 mm Länge herausgeschnitten, das genau die Zone von 2—7 mm hinter der Wurzelspitze umfaßte.

Die Versuche wurden ebenfalls in Petrischalen durchgeführt (⌀ 10 cm, bei Segmenten ⌀ 8 cm). Diese enthielten 2 gewässerte Rundfilter bzw. nur 1 (Segmente). Sie waren mit 7 (*Triticum*), 6 (*Lepidium* und *Linum*) oder 2,5 (Segmente) ml der zu untersuchenden Testlösung beschickt. Die Testlösung enthielt $Ca(NO_3)_2$

(10^{-3} M) und Phosphatpuffer (10^{-2} M, p_H 6,5); außerdem die zu untersuchenden Substanzen. Diese waren IES, PCIB und NMSP sowie aus *Pisum*-Wurzeln extrahierter HS. In der Lösung blieben die Objekte zu je 20 in einer Schale während 24 Stunden im Dunkeln bei 27° C. Die Segmente hatten nach dieser Zeit ihr Wachstum bereits beendet. Zusatz von Zucker förderte das Wachstum der Segmente nicht.

Nach Versuchsende wurden die Längen der Objekte gemessen, bei intakten und dekapitierten Wurzeln mit einem Millimetermaßstab, bei Segmenten unter dem Mikroskop in Okulareinheiten. In bestimmten Versuchen wurden die Segmente nach dem Schneiden 2 Stunden lang unter ständigem Schütteln in dest. Wasser gewässert und erst dann in die Versuchsschalen gebracht. Gleich darauf wurden die Längen gemessen; nach Versuchsende für jedes einzelne Segment der Zuwachs bestimmt. Der Berechnung von Mittelwerten und der Signifikanzprüfung wurden die individuellen Zuwachswerte zugrunde gelegt.

Der HS wurde aus Wurzeln junger grüner Erbsenpflanzen (*Pisum sativum*, Senator) mit Äther extrahiert (Methode vgl. LIBBERT 1955c). Es wurde nur die neutrale Extrakt-Fraktion verwendet. Der HS wurde fast immer in derselben Konzentration verwendet, in der er im extrahierten Material (bezogen auf das Frischgewicht) vorlag; eine solche Hemmstoff-Konzentration wurde als 1/1 HS bezeichnet.

Jede Versuchsserie bestand aus mehreren gleichartigen Versuchen. Jeder einzelne Versuch wurde im t-Test nach PÄTAU (1943) ausgewertet. Weitere Absicherung wurde durch Vereinigung der Ergebnisse aller Versuche der Serie über χ^2 erreicht (PÄTAU). Alle in den Tabellen angegebenen *P*-Werte sind über χ^2 erhaltene gemeinsame *P*-Werte der jeweiligen Versuchsserie.

Ergebnisse

An intakten Wurzeln von *Linum* und *Triticum* wurden durch IES nur Hemmungen erzielt (Tabelle 1): Der Auxingehalt der Wurzeln ist überoptimal (vgl. ÅBERG 1950, 1952; BURSTRÖM 1942—1957).

Die Adventivwurzeln von *Triticum*, die zu Beginn des Versuches höchstens 2 mm lang waren, sind gegen IES resistent. Das ist eine Adaptationserscheinung, die nicht restlos geklärt ist (BURSTRÖM 1957). — Bei Wurzeldekapitation bleibt die Auxinkonzentration überoptimal (Tabelle 1). Auch die quantitativen Verhältnisse bleiben dieselben. Folglich ist der Einfluß der IES auf intakte Wurzeln in den vorliegenden Versuchen im wesentlichen eine Beeinflussung der Zellstreckung.

Lepidium-Wurzeln werden dagegen durch niedrige IES-Konzentrationen signifikant gefördert (vgl. MOEWUS 1949, POHL 1952). Ihr Auxingehalt ist demnach unteroptimal. Auch an Wurzelsegmenten von *Linum* und *Triticum* ist der Auxingehalt unteroptimal: Sie werden stark durch IES-Zugabe gefördert. Folglich werden intakte Wurzeln dieser Arten nur darum nicht durch Auxin gefördert, weil ihr Auxingehalt zu hoch ist; nicht etwa, weil eine Förderung prinzipiell unmöglich ist, wie zuweilen angenommen wird.

ÅBERG und JÖNSSON (1955) erhielten an Erbsenwurzel-Segmenten keine Förderungen durch IES. Offensichtlich war die niedrigste untersuchte Konzentration noch zu hoch; denn an Erbsenwurzelsegmenten liegen Befunde über Förderungen durch IES vor (AUDUS und DAS, AUDUS und SHIPTON, AUDUS und THRESH,

Tabelle 1. *Wirkung von Indol-3-essigsäure auf das Wurzelwachstum. Zuwachs in Prozent der Kontrolle*

	IES-Konzentration (Mol)							Zahl der Versuche	P		Kontrolle in mm
	0	10^{-13}	10^{-11}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}		1	2	
Linum, intakt . . .	100[1]	102	93	78[1]	72	—	42	7	< 0,001		10,1
Triticum, intakt, Primärwurzel . .	100[1]	99	99	100	89[1]	—	68	4	< 0,001		24,5
Triticum, intakt, Adventivwurzeln .	100	101	97	97	99	—	97	4			18,5
Linum, dekapitiert .	100[1]	96	96	75	62[1]	—	—	10	< 0,001		2,2
Triticum, dekapitiert, Primärwurzel . .	100[1]	99	102	96	66[1]	—	—	6	< 0,002		1,3
Triticum, dekapitiert, Primärwurzel (Adventivwurzeln entfernt)	100[1]	102	99	89	64[1]	—	—	11	< 0,001		1,0
Lepidium, intakt . .	100[1, 2]	108	120[1]	95	74[2]	—	53	7	< 0,001	< 0,002	10,1
Linum, Segment . .	100[1, 2]	139[1]	168	143	64[2]	37	6	4	< 0,001	< 0,001	0,15
Triticum, Segment .	100[1, 2]	140	192[1]	162	66[2]	—	21	4	< 0,001	< 0,001	0,20
Linum, intakt, Zusatz von $^1/_1$ HS	100[1]	103	109[1]	95	89	—	—	9	< 0,001		7,6
Triticum, intakt, Primärwurzel, Zusatz von $^1/_1$ HS	100[1]	117[1]	119	105	96	—	—	2	< 0,001		14,9
Triticum, intakt, Adventivwurzeln, Zusatz von $^1/_1$ HS	100[1]	115[1]	119	106	102	—	—	2	< 0,001		14,1
Lepidium, intakt, Zusatz von $^1/_1$ HS	100[1]	114[1]	116	108	97	—	—	5	< 0,001		6,8

Kefford, Leopold und Klein). Eine relative Insensibilität von Wurzelsegmenten gegen Hemmungen durch IES, wie sie Åberg u. Jönsson beschrieben, ist weder aus den eben zitierten Arbeiten noch aus den vorliegenden Versuchen zu entnehmen.

Das wichtigste Ergebnis der Tabelle 1 sind die Kombinationsversuche HS + IES. (Bei jedem Versuch lief eine in der Tabelle nicht angeführte Kontrolle ohne IES und ohne HS mit; die Hemmung durch HS allein war sehr signifikant.) Während intakte *Triticum*- und *Linum*-Wurzeln durch IES allein nicht gefördert werden, wird die vom HS ausgeübte Hemmung durch IES antagonisiert. Auch die fördernde IES-Wirkung an intakten *Lepidium*-Wurzeln verschiebt sich bei HS-Zugabe zu höheren Konzentrationen. Bereits damit ist eine *Wechselwirkung zwischen IES und HS* wahrscheinlich gemacht (Interpretation vgl. Diskussion).

Der HS hat, allein geboten, keinen Förderungsbereich: In keiner Verdünnung von 3/1 bis 1/256 fördert er das Wachstum intakter Wurzeln aller 3 Objekte, ebensowenig das von Wurzelsegmenten.

Die Versuche mit NMSP (Tabelle 2) an intakten Wurzeln von *Linum* und *Triticum* sowie an dekapitierten Wurzeln sind mit der herrschenden Theorie vereinbar: Diese Objekte, die durch Auxin gehemmt werden, werden durch NMSP gefördert. Anders die Experimente

Tabelle 2. *Wirkung von 1-Naphthylmethylsulfidpropionsäure auf das Wurzelwachstum. Zuwachs in Prozent der Kontrolle*

	NMSP-Konzentration (Mol)						Zahl der Versuche	P	Kontrolle in mm
	0	10^{-7}	10^{-6}	3×10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}			
Linum, intakt	100[1]	104	107	124[1]	152	157	4	<0,001	11,6
Triticum, intakt, Primärwurzel	100[1]	97	100	103	111[1]	108	3	<0,001	23,8
Triticum, intakt, Adventivwurzeln	100[1]	97	100	102	107[1]	114	3	<0,001	17,2
Lepidium, intakt	100[1]	102	114	131[1]	153	179	3	<0,001	9,8
Triticum, dekapitiert, Primärwurzel	100[1]	—	—	134	159[1]	145	5	<0,01	1,0
Linum, Segment	100[1]	—	138	200[1]	190	125	2	<0,001	0,16
Triticum, Segment	100[1]	—	124	163[1]	158	131	4	<0,001	0,22
Linum, intakt, Zusatz von $^1/_1$ HS	100[1]	—	—	108	139[1]	178	4	<0,001	8,5
Triticum, intakt, Primärwurzel, Zusatz von $^1/_1$ HS	100[1]	—	—	100	113[1]	117	2	<0,001	16,3
Triticum, intakt, Adventivwurzeln, Zusatz von $^1/_1$ HS	100[1]	—	—	103	109[1]	120	2	<0,001	15,3
Lepidium, intakt, Zusatz von $^1/_1$ HS	100[1]	—	114	124[1]	164	198	2	<0,001	7,1
Triticum, intakt, Primärwurzel, Zusatz von 10^{-7} IES	100[1]	—	—	102	109[1]	113	5	<0,001	21,5
Lepidium, intakt, Zusatz von 10^{-7} IES	100[1]	110	121	146[1]	158	194	2	<0,001	6,6
Linum, intakt, Zusatz von 10^{-5} IES.	100[1]	—	—	110	146[1]	146	2	<0,001	3,9
Triticum, intakt, Primärwurzel, Zusatz von 10^{-5} IES	100	—	—	98	97	95	3		15,3
Lepidium, intakt, Zusatz von 10^{-5} IES.	100[1]	96	102	108	116[1]	123	4	<0,001	5,8

an Objekten mit unteroptimalem Auxingehalt (*Lepidium*-Wurzeln, Wurzelsegmente): Hier werden sehr signifikante *Förderungen sowohl durch IES als auch durch NMSP* erzielt. Dieses Ergebnis an *Lepidium* entspricht dem in der Einleitung erwähnten an einigen Mais-Sorten (PORTER); das Ergebnis an Segmenten dem an *Pisum*-Wurzelsegmenten (AUDUS und DAS). Zwei mögliche Erklärungen: Entweder NMSP wirkt hier nicht als Antiauxin, sondern möglicherweise als Antagonist

zu einem in der Wurzel vorhandenen Inhibitor. Oder: NMSP kompensiert nur die hemmende, nicht aber die fördernde Auxinwirkung. Nach der eingangs formulierten Arbeitshypothese können diese beiden Erklärungen identisch sein: Danach ist die hemmende Auxinwirkung eine Hemmung durch den Hemmstoff B (spezifisch gebundenes Auxin).

Åberg und Jönsson fanden an *Pisum*-Wurzelsegmenten keine Förderungen durch NMSP. Audus und Das erhielten am selben Objekt mit derselben Methode signifikante Förderungen. Schwerlich beruht diese Differenz auf der Verschiedenheit der verwendeten Erbsensorten.

Bei HS-Zusatz zu intakten Wurzeln (Tabelle 2) sind die prozentualen Förderungen durch die höheren NMSP-Konzentrationen größer als ohne HS-Zusatz. Das ist mit der Hypothese vereinbar, daß NMSP ein Antagonist zu dem HS sei. — Bei Zusatz von IES 10^{-7} M zu intakten Wurzeln sind die prozentualen Förderungen durch die höheren NMSP-Konzentrationen ebenfalls größer. Dafür kann dieselbe Erklärung gelten; denn nach der obigen Arbeitshypothese muß erhöhte Auxinkonzentration eine erhöhte Hemmstoff-Konzentration ergeben. — Bei Zufuhr von IES 10^{-5} M dagegen sind die prozentualen Förderungen durch NMSP schwächer als ohne Auxinzusatz; bei *Triticum* ist dann gar keine Förderung mehr zu erzielen. Daraus folgt, daß die Hemmungen durch IES 10^{-7} und durch IES 10^{-5} M ursächlich verschieden sind (vgl. Diskussion).

Auf Grund der Annahme, daß NMSP als Antagonist zu einem nativen Hemmstoff wirken solle, wurde versucht, diesen Hemmstoff aus den Wurzelsegmenten auszuwaschen. Dann dürfte NMSP nicht mehr fördern. Wider Erwarten gelang dieser Versuch sofort: Nach 2stündigem Wässern der Segmente konnte keine NMSP-Förderung erzielt werden (Tabelle 3). Das scheint tatsächlich auf der Auswaschung von HS zu beruhen; denn bei äußerlicher Zufuhr von HS zu gewässerten Segmenten werden die ursprünglichen Verhältnisse wiederhergestellt (Tabelle 3). Damit ist außerdem bewiesen: *1. Der Hemmstoff ist an der Regulation des Wurzelwachstums beteiligt. 2. Die Wirkung von NMSP auf das Wurzelwachstum hängt mit diesem Hemmstoff zusammen.* — Die signifikante Hemmung gewässerter Segmente durch NMSP 3×10^{-6} M halte ich für eine unspezifische (toxische?) Wirkung, die normalerweise durch die spezifische NMSP-Wirkung überlagert wird. — Bei Zugabe von IES zu gewässerten Segmenten wirkt NMSP (bei HS-Abwesenheit) ebenso wie ohne IES-Zufuhr (Tabelle 3). Demnach ist der scheinbare Antagonismus der NMSP zu IES nur indirekter Natur und wird durch den HS vermittelt.

Es wurde eingangs eine Beziehung der Inhibitoren zum Auxin angenommen. Dann muß sich eine Hemmstoffauswaschung auch auf die Wirkung von IES auswirken. Das ist der Fall (Tabelle 4): Die höheren IES-Konzentrationen (10^{-7} und 10^{-6} M), die an intakten Wurzeln und an ungewässerten Segmenten hemmen, bewirken an gewässerten Segmenten Förderungen. Die IES-Wirkung auf gewässerte Segmente ähnelt der IES-Wirkung auf Sproßsegmente. Bei äußerlicher Zufuhr

Tabelle 3. *Wirkung von NMSP auf das Wachstum gewässerter Wurzelsegmente. Zuwachs in Prozent der Kontrolle*

	NMSP-Konzentration (Mol)					Zahl der Versuche	P	Kontrolle in mm
	0	10^{-6}	3×10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}			
Linum, gewässertes Segment	100[1]	92	78	47[1]	26	3	$<0{,}001$	0,10
Triticum, gewässertes Segment	100[1]	96	68	33[1]	24	3	$<0{,}001$	0,09
Linum, gewässertes Segment Zusatz von $^1/_1$ HS	100[1]	150	250[1]	248	120	4	$<0{,}001$	0,04
Triticum, gewässertes Segment Zusatz von $^1/_1$ HS	100[1]	136	172[1]	152	103	5	$<0{,}001$	0,05
Linum, gewässertes Segment, Zusatz von 10^{-5} IES . .	100[1]	100	80	45[1]	34	4	$<0{,}001$	0,03
Triticum, gewässertes Segment Zusatz von 10^{-5} IES . .	100[1]	104	77	38[1]	28	4	$<0{,}001$	0,04

Tabelle 4. *Wirkung von IES auf das Wachstum gewässerter Wurzelsegmente. Zuwachs in Prozent der Kontrolle*

	IES-Konzentration (Mol)							Zahl der Versuche	P		Kontrolle in mm
	0	10^{-13}	10^{-11}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}		1	2	
Linum, gewässertes Segment	100[1, 2]	—	160	194	222[1]	127[2]	28	4	$<0{,}001$	$>0{,}05$	0,07
Triticum, gewässertes Segment	100[1]	—	164	186	188	148[1]	54	3	$<0{,}001$		0,09
Linum, gewässertes Segment, Zusatz von $^1/_1$ HS	100[1, 2]	149	168[1]	167	60[2]	14	—	5	$<0{,}001$	$<0{,}002$	0,05
Triticum, gewässertes Segment, Zusatz von $^1/_1$ HS	100[1, 2]	134	166[1]	160	54[2]	30	—	3	$<0{,}001$	$<0{,}01$	0,06

von HS werden die ursprünglichen Verhältnisse wiederhergestellt. Damit ist erneut gezeigt, daß der Effekt der Wässerung auf einer Hemmstoffauswaschung beruht, *daß der Hemmstoff an der Regulation des Wurzelwachstums beteiligt ist*, und weiter, *daß die hemmende Wirkung von IES mit diesem Hemmstoff zusammenhängen muß*. Die Änderung des Reaktionsvermögens der Segmente gegenüber Auxin läßt sich nicht durch eine Beeinflussung von IES-Oxydasen erklären; denn die HS-Extrakte sind ohne Einfluß auf die IES-Oxydase (LIBBERT, unveröffentlicht). — Durch IES 10^{-5} M wird eine Hemmung auch bei gewässerten Segmenten erzielt. Diese Hemmung geht also nicht auf eine Hemmstoffumwandlung zurück; sondern sie ist ursächlich anders als die Hemmung durch IES 10^{-7} M (vgl. Diskussion).

PCIB verhält sich in allen Punkten wie ein ideales Antiauxin (Tabelle 5): Es kompensiert alle IES-Wirkungen erster Ordnung, sowohl

Tabelle 5. *Wirkung von 4-Cl-Phenoxyisobuttersäure auf das Wurzelwachstum. Zuwachs in Prozent der Kontrolle*

	PCIB-Konzentration (Mol)						Zahl der Versuche	P		Kontrolle in mm
	0	10^{-7}	10^{-6}	3×10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}		1	2	
Linum, intakt	100[1]	112	122[1]	126	131	114	4	<0,001		9,9
Triticum, intakt, Primärwurzel	100[1]	103	109[1]	116	130	123	2	<0,002		25,6
Triticum, intakt, Adventivwurzeln . .	100[1]	103	117[1]	129	148	155	2	<0,001		17,0
Triticum, dekapitiert, Primärwurzel	100[1]	—	—	154	194[1]	187	2	<0,01		0,9
Lepidium, intakt . . .	100[1]	100	91	82[1]	74	65	7	<0,001		9,2
Linum, Segment . . .	100[1]	—	52	28[1, 2]	65	160[2]	2	<0,001	<0,001	0,13
Triticum, Segment . .	100[1]	—	79	44[1, 2]	85	148[2]	2	<0,001	<0,001	0,25
Linum, gewässertes Segment	100[1]	—	62	46[1]	46	47	3	<0,001		0,09
Triticum, gewässertes Segment	100[1]	—	63	56[1]	46	35	5	<0,001		0,09
Triticum, gewässertes Segment, Zusatz $^1/_1$ HS	100[1]	—	80	59[1, 2]	80	98[2]	4	<0,001	<0,01	0,05
Linum, Segment, Zusatz 10^{-7} IES	100[1]	—	173	289[1]	240	161	3	<0,001		0,05
Triticum, Segment, Zusatz 10^{-7} IES . .	100[1]	—	174	280[1]	191	134	2	<0,001		0,06
Linum, gewässertes Segment, Zusatz 10^{-5} IES	100[1]	—	108	94	84	42[1]	4	<0,002		0,03
Triticum, gewässertes Segment, Zusatz 10^{-5} IES	100[1]	—	94	63	46[1]	18	8	<0,001		0,04
Linum, intakt, Zusatz 10^{-7} IES . . .	100[1]	—	147	164[1]	187	122	3	<0,001		7,5
Triticum, intakt, Primärwurzel, Zusatz 10^{-7} IES	100[1]	—	114[1]	115	135	137	2	<0,001		19,2
Lepidium, intakt, Zusatz 10^{-7} IES . .	100[1]	98	105	115[1]	108	—	7	<0,001		5,9
Triticum, intakt, Primärwurzel, Zusatz $^1/_1$ HS	100[1]	—	108	118[1]	135	135	2	<0,002		18,0
Triticum, intakt, Adventivwurzeln, Zusatz $^1/_1$ HS	100[1]	—	112	130[1]	155	160	2	<0,001		16,4
Lepidium, intakt, Zusatz $^1/_1$ HS	100	99	103	102	92	—	4			6,0
Linum, intakt, Zusatz $^1/_1$ HS	100	—	96	103	103	93	3			8,6
Linum, gewässertes Segment, Zusatz $^1/_1$ HS .	100[1]	—	85	67[1]	42	40	12	<0,001		0,04

fördernde als auch hemmende. Bei Objekten mit überoptimalem Auxingehalt fördert PCIB. Daß dekapitierte Wurzeln stärker gefördert

werden als intakte, mag damit zusammenhängen, daß die Meristemtätigkeit, die bei dekapitierten Wurzeln ausgeschaltet ist, durch PCIB gehemmt wird (BURSTRÖM 1950). Dieselbe Erklärung läßt sich evtl. auch auf NMSP (Tabelle 2) anwenden. Objekte mit unteroptimalem Auxingehalt werden schon durch PCIB 10^{-6} M gehemmt. Das läßt sich als antagonistischer Effekt gegen das native Auxin deuten.

Bei hoher PCIB-Konzentration (10^{-4} M) werden jedoch ungewässerte Segmente gefördert. Hier setzt sich offensichtlich (konzentrationsbedingt) die antagonistische Wirkung von PCIB auf die hemmende Auxinwirkung, also auf das Hemmstoffsystem durch (vgl. Diskussion). An gewässerten Segmenten tritt diese Förderung nicht auf; durch Zusatz von HS wird bei *Triticum* der frühere Zustand annähernd wiederhergestellt. — Bei intakten *Lepidium*-Wurzeln tritt aber keine Förderung durch PCIB 10^{-4} M auf. Sicherlich ist daran die Hemmung der Zellteilung durch PCIB beteiligt (s. oben).

AUDUS und DAS fanden keine signifikante Förderung von *Pisum*-Wurzelsegmenten durch PCIB, da die höchste von diesen Autoren untersuchte Konzentration 10^{-5} g/ml war. Allerdings fanden AUDUS und DAS auch keine signifikanten Hemmungen durch PCIB.

Hemmungen an Wurzelsegmenten, die durch IES 10^{-7} M induziert wurden, werden durch PCIB antagonisiert: Auch hier wirkt PCIB als Antiauxin. — Dagegen werden Hemmungen, die durch IES 10^{-5} M induziert wurden, nicht durch PCIB antagonisiert. Das ist ein weiterer Beleg dafür, daß die Hemmungen durch IES 10^{-7} M und durch IES 10^{-5} M ursächlich verschieden sind.

Zusatz von IES 10^{-7} M oder von HS zu intakten Wurzeln kann nach den skizzierten Anschauungen gesteigerte Hemmstoffumwandlung bewirken. PCIB, die mit der IES-Wirkung (also auch der Hemmstoffumwandlung) interferiert, wird an derart gehemmten Wurzeln stärkere Förderungen erreichen können als an ungehemmten Wurzeln (Tabelle 5). Besonders deutlich ist das bei *Lepidium:* Ohne Auxinzufuhr ist der Auxingehalt unteroptimal; und PCIB fördert nicht. Bei Zufuhr von IES 10^{-7} wird der Auxingehalt überoptimal; und PCIB fördert. Bei HS-Zufuhr zu *Lepidium* kommt es zwar nicht zu Förderungen durch PCIB, aber die von PCIB ausgeübte Hemmung ist geringer als ohne HS-Zufuhr.

Die beiden letzten Versuchsserien der Tabelle 5 zeigen, daß nach HS-Zusatz zu *Linum* (im Unterschied zu *Triticum*) jede Förderung durch PCIB verhindert ist. Auf die Möglichkeit artspezifischer Unterschiede im Auxin-Reaktionssystem der Wurzel hat schon ÅBERG (1955) aufmerksam gemacht. Hier lassen sich diese Unterschiede auf Grund quantitativer Differenzen im Gehalt der Wurzeln an den Hemmstoffen erklären (vgl. Diskussion). Durch NMSP wird aber an *Linum* (im Gegensatz zu PCIB) bei HS-Zufuhr eine besonders starke Förderung erreicht. Das deutet darauf hin, daß die Wirkungen von PCIB und NMSP auf die durch Auxin erzielte Hemmung, also auf das Hemmstoffsystem, ursächlich verschieden sind (vgl. Diskussion).

Diskussion

Es wurde gezeigt, daß in Wurzeln *ein Hemmstoff-System an der Regulation des Wachstums beteiligt* ist. Denn durch Auswaschen einer Komponente des Hemmstoffsystems wird die Reaktion von Wurzelsegmenten auf Wachstums-Regulatoren charakteristisch verändert; und durch anschließende Zufuhr extrahierter Hemmstoffe wird die ursprüngliche Reaktion wiederhergestellt. — Es ist anzunehmen, daß nicht das

ganze, aus Hemmstoff A und Hemmstoff B bestehende System ausgewaschen wurde, sondern nur der Hemmstoff A; denn dieser ist im Unterschied zum Hemmstoff B leicht wasserlöslich (LIBBERT 1955c).

Des weiteren muß Auxin an der Regulation des Wurzelwachstums beteiligt sein: Wenn die Konzentration des endogenen Auxins eines Wurzelgewebes erniedrigt wird (Verwendung von Wurzelsegmenten statt intakter oder dekapitierter Wurzeln), dann wird die Reaktion dieses Gewebes auf PCIB spezifisch verändert; und durch anschließende Zufuhr von IES wird die ursprüngliche Reaktion wiederhergestellt.

Wenn durch Auswaschen des Hemmstoffes A das Hemmstoffsystem verändert wird, bleiben die Förderungen durch niedrige Auxinkonzentrationen unverändert; die Hemmungen durch höhere Auxinkonzentrationen werden dagegen weitgehend verhindert. *Folglich ist das Hemmstoffsystem an der Hemmung beteiligt, die Auxin ausübt.* Im Zusammenhang damit, daß aus Hemmstoff B durch milde Hydrolyse Auxin frei wird (LIBBERT 1955d), und mit anderen Befunden (HÖPFNER; LIBBERT 1955b) sind diese Ergebnisse eine Stütze für folgende Ansicht: Auxin wird an den spezifischen Partner Hemmstoff A unter Entstehung von Hemmstoff B (spezifisch gebundenes Auxin) gebunden, und dieser Hemmstoff bewirkt die Hemmung des Wurzelwachstums.

Die Reaktion einer Wurzel auf Auxin kommt demnach durch Überlagerung zweier ursächlich verschiedener Einzelwirkungen zustande: Einer fördernden, die bei geringen Auxinkonzentrationen überwiegt, und einer hemmenden, die bei höheren Auxinkonzentrationen überwiegt. Aussagen über den über- oder unteroptimalen Auxingehalt einer intakten Wurzel beziehen sich auf die Konzentrations-Wirkungskurve, die durch Überlagerung der beiden Auxinwirkungen entsteht.

Ein ideales Antiauxin (PCIB) interferiert mit beiden Auxinwirkungen, der Förderung und der Hemmung. Bei der ersten Publikation der Hypothese über den Hemmstoffeinfluß auf das Wurzelwachstum (LIBBERT 1955b) wurde angenommen, daß Hemmstoff B unmittelbarer Regulator des Wurzelwachstums sei. Freies Auxin würde dann nur als kompetitiver Antagonist das Wurzelwachstum fördern. Diese Ansicht war falsch: Dann könnte ein Antiauxin (PCIB) nicht imstande sein, diese Förderungen zu antagonisieren. *Der unmittelbare Regulator muß das Auxin sein.* PCIB wirkt am selben Wachstumszentrum kompetitiv. Der zweite Angriffspunkt von PCIB muß ebenfalls derselbe sein wie der zweite Angriffspunkt des Auxins, er muß mit dem Hemmstoffsystem zusammenhängen.

An Wurzelsegmenten (unteroptimaler Auxingehalt) bringt die sehr hohe PCIB-Konzentration 10^{-4} M eine Förderung zustande, die mit dem Hemmstoffsystem zusammenhängt (Tabelle 5). Wahrscheinlich wirkt PCIB (ebenso wie IES) in Abhängigkeit von seiner Konzentration auf die beiden Prozesse mit unterschiedlicher Stärke: Bei sehr hoher PCIB-Konzentration überwiegt trotz unteroptimaler

Auxinkonzentration die PCIB-Wirkung am Hemmstoffsystem über die PCIB-Wirkung an *dem* Wachstumszentrum, wo die Auxinförderung ansetzt.

NMSP ist kein ideales Antiauxin: Sie interferiert nur mit der hemmenden Auxinwirkung, nicht mit der fördernden. NMSP fördert alle untersuchten Objekte, unabhängig davon, ob ihr Auxingehalt unter- oder überoptimal ist. Nur durch Hemmstoff-Auswaschung läßt sich die fördernde NMSP-Wirkung verhindern. *Der Angriffspunkt der NMSP ist demnach das Hemmstoffsystem,* wo sie antagonistisch zu Auxin wirkt.

Da bei HS-Zufuhr zu *Linum* NMSP und PCIB ganz verschieden wirkten, wurde angenommen, daß NMSP und PCIB hinsichtlich des Hemmstoffsystems verschiedene Angriffspunkte hätten. Gibt es aber 2 verschiedene Wege, auf denen das Hemmstoffsystem kompetitiv beeinflußt werden kann? Offensichtlich nicht, wenn Auxin und Hemmstoff B am selben Wachstumszentrum angreifen (Hemmstoff B also nur als Antiauxin aktiv ist). Wenn aber der Hemmstoff B einen eigenen Angriffspunkt (etwa in einer 2. Wachstumsphase) hat, dann ist dieser Hemmstoff selbst als Wachstumsregulator aktiv; dann kann auf 2 verschiedenen Wegen kompetitiv in das Hemmstoffsystem eingegriffen werden: Durch Interferenz mit der Entstehung von Hemmstoff B einerseits und durch Interferenz mit dem Hemmstoff B am Wachstumszentrum andererseits. Unter dieser Voraussetzung sind auch die unterschiedlichen Wirkungen von NMSP und PCIB auf HS-behandelte *Linum*-Wurzeln zu verstehen:

NMSP möge kompetitiv am Wachstumszentrum mit Hemmstoff B interferieren. Bei Zufuhr von HS würde die Konzentration des Hemmstoffes B sehr erhöht (auch bei gewässerten Segmenten, da Hemmstoff B sicherlich nicht mit ausgewaschen wird, s. oben). Deshalb kann die Wirkung von NMSP in höheren Konzentrationen besonders stark werden. — PCIB möge dagegen hemmend in die Entstehung des Hemmstoffes B eingreifen (vielleicht durch kompetitive Interferenz mit freiem Auxin am spezifischen Bindungspartner des Auxins, dem Hemmstoff A). Bei Zufuhr von HS kann die Konzentration von Hemmstoff B so hoch werden, daß es keine Rolle spielt, ob die Neubildung des Hemmstoffes B ungehemmt ist oder durch PCIB-Zufuhr gehemmt wird.

Diese Interpretation kann für *Linum* gelten. HS-behandelte *Triticum*-Wurzeln werden aber durch PCIB gefördert. Wahrscheinlich ist die Konzentration des Hemmstoffes B in *Triticum*-Wurzeln geringer als in *Linum*-Wurzeln; dann bliebe auch bei HS-Zufuhr die Konzentration des Hemmstoffes B niedrig genug, um einen Einfluß von PCIB auf die Neubildung von Hemmstoff B wirksam werden zu lassen. Einen Hinweis darauf geben einige Versuche, den Hemmstoffgehalt von *Linum*- und *Triticum*-Wurzeln vergleichsweise durch Extraktion zu erfassen und zu testen: Die Hemmstoffextrakte (Konzentration $^1/_2$) aus *Linum*-Wurzeln hemmten signifikant stärker als die aus *Triticum*-Wurzeln.

Die Ergebnisse der Kombinationsversuche zwischen IES und HS (Tabelle 1) sind dann so zu verstehen: Durch die HS-Zufuhr wird diejenige Phase des Wurzelwachstums, in die der Hemmstoff B eingreift, stark gehemmt. Deshalb treten die Auxinwirkungen auf die andere Phase des Wurzelwachstums, die durch Auxin gefördert wird, in den Vordergrund.

Durch die hohe Auxinkonzentration 10^{-5} M wird eine Hemmung ausgeübt, die von den Hemmungen durch IES 10^{-7} M ursächlich verschieden ist: Erstere tritt auch nach Hemmstoffauswaschung auf und

ist durch PCIB und NMSP nicht antagonisierbar. Entweder ist die Hemmung durch IES 10^{-5} M eine Wirkung 2. Ordnung wie etwa die Hemmung des Coleoptilwachstums durch hohe Auxinkonzentrationen; dann kann sie nicht antagonisiert werden durch NMSP oder durch ein Antiauxin (Foster u. a. 1955). Oder diese Hemmung ist eine beginnende toxische Wirkung; dann kann sie ebensowenig antagonisiert werden.

Ich fasse meine Vorstellungen über die Regulation des Wurzelwachstums zusammen: *Es gibt 2 Wachstumszentren in der Wurzel. Am*

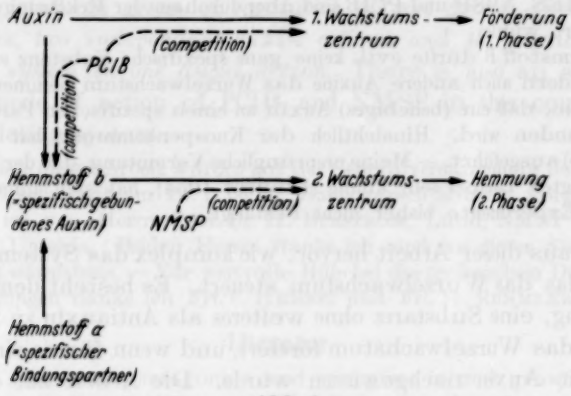


Abb. 1

1. Wachstumszentrum fördert freies Auxin. Am 2. Wachstumszentrum hemmt spezifisch gebundenes Auxin (= Hemmstoff B). Spezifisch gebundenes Auxin (Hemmstoff B) entsteht durch Bindung des freien Auxins an einen spezifischen Bindungspartner (= Hemmstoff A). PCIB interferiert mit freiem Auxin sowohl am 1. Wachstumszentrum als auch am spezifischen Bindungspartner. NMSP interferiert mit spezifisch gebundenem Auxin (Hemmstoff B) am 2. Wachstumszentrum. Es ist nicht ausgeschlossen, daß das 1. Wachstumszentrum Burström's (1942) 1. Phase, und daß das 2. Wachstumszentrum seine 2. Phase des Wurzelwachstums steuert. — Diese Vorstellungen sind, wie nicht betont zu werden braucht, in einzelnen Teilen hypothetisch.

Die Annahme, daß IES in Wurzeln in einen Inhibitor umgewandelt werden kann, wurde auch von Ball (1953) gemacht. Umfangreiche Beweise dafür lieferte Höpfner. Diese werden z. Z. auf andere Arten als *Pisum* ausgedehnt. Die obige Ansicht über die Wirkung von NMSP stimmt gut mit der Annahme Streets überein: NMSP sei ein Antagonist zu einem endogenen Regulator, der in hemmender Konzentration in der Wurzel vorhanden sei, nicht mit Auxin identisch, aber auxin-ähnlich sei. Auch Audus (1954) und Audus und Shipton (1952) erwogen, ob die Antiauxine in Wurzeln Antagonisten eines nativen Inhibitors sein könnten. Die Argumente, die Audus und Das (1955) zur Aufgabe dieser Ansicht

bewogen[1], richten sich gegen *die* Annahme, daß ein nativer Inhibitor der einzige unmittelbare Regulator sei, und daß Auxin nicht direkt, sondern nur als „Anti-Inhibitor" ohne eigene Aktivität fördern könne. Diese Annahme wurde auch in der vorliegenden Arbeit als unhaltbar befunden.

Die hier ausgesprochene Vorstellung über die PCIB-Wirkung deckt sich mit der Ansicht BURSTRÖMS (1950): PCIB soll sowohl in der 1. als auch in der 2. Phase des Wurzelwachstums antagonistisch zu Auxin wirken.

AUDUS und DAS glauben, daß PCIB und NMSP dieselbe Primärwirkung haben sollen wie Auxin[1]. Damit lassen sich die vorliegenden Ergebnisse nicht interpretieren: Dann müßten an gewässerten Segmenten NMSP und PCIB fördern; denn IES fördert diese Objekte sehr. Die von AUDUS und DAS publizierten Ergebnisse mit IES, NMSP und PCIB sind aber durchaus der Erklärung zugängig, die hier formuliert wurde.

Der Hemmstoff B dürfte evtl. keine ganz spezifische Substanz sein, da nicht nur IES, sondern auch andere Auxine das Wurzelwachstum hemmen. Spezifisch dürfte nur sein, daß ein (beliebiges) Auxin an einen spezifischen Partner (Hemmstoff A) gebunden wird. Hinsichtlich der Knospenhemmung hat das kürzlich SÖDING (1956) ausgeführt. — Meine ursprüngliche Vermutung, daß der Hemmstoff A ein ungesättigtes Lacton sein könne (LIBBERT 1954), hat sich anhand noch unpublizierter Experimente bisher nicht bestätigt.

Es geht aus dieser Arbeit hervor, wie komplex das System beschaffen sein muß, das das Wurzelwachstum steuert. Es besteht demnach keine Berechtigung, eine Substanz ohne weiteres als Antiauxin zu bezeichnen, wenn diese das Wurzelwachstum fördert, und wenn für sie eine Wechselwirkung mit Auxin nachgewiesen wurde. Die Arbeit hat die Vielfalt der Möglichkeiten auch nur angedeutet, die für das Eingreifen eines Regulators in das System besteht, durch das das Wurzelwachstum reguliert wird.

Summary

Intact and decapitated roots and root sections of *Lepidium*, *Triticum*, and *Linum* have been grown in buffered solutions containing IAA, PCIB, NMSP, and an inhibitor extracted from *Pisum* roots (components given separatively as well as in combination). Growth of intact *Lepidium* roots and of root sections was stimulated by low auxin concentrations; growth of intact *Triticum* and *Linum* roots was only inhibited by auxin. Influence of PCIB was opposite to auxin influence in all instances. NMSP on the other hand stimulated growth of all objects including those with suboptimal auxin content.

Growth response of root sections to auxin and to NMSP respectively, was changed after an endogenous inhibitor had been washed out: NMSP-induced stimulations and IAA-induced inhibitions were nullified

[1] *Anmerkung während der Korrektur.* In einer während der Drucklegung erschienenen Arbeit [AUDUS u. BROWNBRIDGE: J. of exper. Bot. 8, 235 (1957)] verwirft AUDUS die zusammen mit DAS vorgebrachten Einwände und kehrt zu der Ansicht zurück, „that...NMSP may stimulate root growth... by interfering with the synthese or distribution of a natural endogenous inhibitor, which is not IAA."

whilst IAA-induced stimulations persisted. The normal growth response was retained by adding the inhibitor extract mentioned above. Added inhibitor extract changed the growth regulator response of intact roots too; the inhibition of *Triticum* and *Linum* roots exerted by inhibitor extract was counteracted by low concentrations of IAA for instance.

The conclusions drawn from these and other results are the following: *There is an endogenous inhibitor system participating in regulation of root growth. There are interactions between this inhibitor system and auxin.* An attempt has been made to define the mode of action of the inhibitor system. A picture is given of *regulation of root growth including two growth centers, two independent auxin actions and the participation of the inhibitor system in one auxin action.* There is also an attempt to define the mode of action of PCIB and NMSP in this complex root growth regulating system.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden auf der Generalversammlung der Deutschen Botanischen Gesellschaft am 24. 5. 56 in Hannoversch-Münden vorgetragen. — PCIB erhielt ich von Herrn Prof. Dr. H. Burström, Lund, NMSP von Herrn Dr. B. Åberg, Uppsala. Beiden Herren danke ich auch an dieser Stelle für ihre Freundlichkeit wärmstens. — Für wertvolle Hilfe bei der technischen Durchführung der Untersuchungen danke ich Frl. C. Herbst und Frl. H. Rummler herzlich.

Literatur

Åberg, B.: On auxin antagonists and synergists in root growth. Physiol. Plantarum (Copenh.) **3**, 447 (1950). — On the effects of weak auxins and antiauxins upon root growth. Physiol. Plantarum (Copenh.) **5**, 305 (1952). — On the effects of para-substitution in some plant-growth regulators with phenyl nuclei. In: The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances, p. 93, edit. R. L. Wain and F. Wightman. London 1955. — Åberg, B., and E. Jönsson: Studies on plant growth regulators. XI. Experiments with pea roots, including some observations on the destruction of indoleacetic acid by different types of roots. Kgl. Lantbrukshögsk. Ann. **21**, 401 (1955). — Audus, L. J.: Auxin antagonists and synergists. A critical approach. New Phytologist **53**, 461 (1954). — Audus, L. J., and N. Das: The interaction of auxins and antiauxins in the stimulation of root growth. J. of Exper. Bot. **6**, 328 (1955). — Audus, L. J., and M. E. Shipton: 2,4-Dichloranisole — auxin interactions in root growth. Physiol. Plantarum (Copenh.) **5**, 430 (1952). — Audus, L. J., and R. Thresh: A method of plant growth substance assay for use in paper partition chromatography. Physiol. Plantarum (Copenh,) **6**, 451 (1953). — Baldovinos de la Pena, G.: Growth of the root tip. In: Growth and Differentiation in Plants, p. 27, edit. W. E. Loomis. Ames, Iowa 1949. — Ball, N. G.: The influence of certain growth-regulating substances on the rhizomes of Aegopodium podagraria. J. of Exper. Bot. **4**, 349 (1953). — Burström, H.: The influence of heteroauxin on cell growth and root development. Kgl. Lantbrukshögsk. Ann. **10**, 209 (1942). — Studies on growth and metabolism of roots. IV. Positive and negative auxin effects on cell elongation. Physiol. Plantarum (Copenh.) **3**, 277 (1950). — Studies on growth and metabolism of roots. XI. The influence of auxin and coumarin derivatives on the cell wall. Physiol. Plantarum (Copenh.) **7**, 548 (1954). — On the adaptation of roots to β-indoleacetic acid. Physiol. Plantarum (Copenh.) **10**, 187 (1957). — Foster, R. J., D. H. McRae and J. Bonner: Auxin-antiauxin interaction at high concentration.

Plant Physiol. **30**, 323 (1955). — Höpfner, K. H.: Noch unveröffentlicht. — Kefford, N. P.: The growth substances separated from plant extracts by chromatography. II. The coleoptile and root elongation properties of the growth substances in plant extracts. J. of Exper. Bot. **6**, 245 (1955). — Leopold, A. C., and F. S. Guernsey: Auxin polarity in the Coleus plant. Bot. Gaz. **115**, 147 (1954). — Leopold, A. C., and W. H. Klein: Maleic hydrazide as an antiauxin. Physiol. Plantarum (Copenh.) **5**, 91 (1952). — Libbert, E.: Das Zusammenwirken von Wuchs- und Hemmstoffen bei der korrelativen Knospenhemmung. 1. II. Planta (Berl.) **44**, 286 (1954); **45**, 68 (1955a). — Die Bedeutung wurzeleigener Hemmstoffe für das Wurzelwachstum. Naturwiss. **42**, 158 (1955b). — Nachweis und chemische Trennung des Korrelationshemmstoffes und seiner Hemmstoffvorstufe. Planta (Berl.) **45**, 405 (1955c). — Die Hydrolyse des „Korrelationshemmstoffes" zu Auxin. Planta (Berl.) **46**, 256 (1955d). — Untersuchungen über die Physiologie der Adventivwurzelbildung. III. Untersuchung der Hemmstoffe, mittels derer eine Wurzel die Adventivwurzelbildung hemmt. Z. Bot. **45**, 57 (1957). — Linser, H.: Zur Wirkungsweise von Wuchs- und Hemmstoffen. IV. Die Konzentrations-Wirkungskurven einiger synthetischer Zellstreckungswuchsstoffe in Gegenwart verschiedener Mengen von synthetischen Hemmstoffen. Biochem. et biophysica Acta (Amsterd.) **15**, 25 (1954). — Moewus, F.: Der Kressewurzeltest, ein neuer quantitativer Wuchsstofftest. Biol. Zbl. **68**, 118 (1949). — Ochs, G.: Zur Wirkungsweise des Wuchsstoffes auf das Wurzelwachstum. Planta (Berl.) **44**, 412 (1954). — Pätau, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen. Biol. Zbl. **63**, 152 (1943). — Pohl, R.: Die Kressewurzel als Testobjekt für Wuchs- und Hemmstoffe. Z. Bot. **40**, 307 (1952). — Pohl, R., u. G. Ochs: Über die Wuchsstoffwirkung beim Streckungswachstum der Wurzel. Naturwis. **40**, 24 (1953). — Porter, W. K.: A study of growth promoting and inhibiting action of auxin in corn-seedlings. Thesis. Univ. Wisconsin 1953. Besprochen in F. Skoog, Substances involved in normal growth and differentiation of plants. Brookhaven Symposia in Biology No 6 [BNL 258 (C—19)], p. 1, 1954. — Söding, H.: Korrelative Hemmung. Z. Bot. **44**, 543 (1956). — Street, H. E.: Factors controlling meristematic activity in excised roots. V. VI. Physiol. Plantarum (Copenh.) **7**, 212 (1954); **8**, 48 (1955). — Tukey, H. B., F. W. Went, R. M. Muir and J. van Overbeek: Nomenclature of chemical plant regulators. Plant Physiol. **29**, 307 (1954).

Dozent Dr. Eike Libbert, Berlin N 4, Hannoversche Str. 27/29

Planta, Bd. 50, S. 41—46 (1957)

ÜBER DIE DOPPELBRECHUNGSERSCHEINUNGEN AN ZELLWAND UND CUTICULA VON DRÜSENHAAREN

Von

KURT FREYTAG

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Juni 1957)

Drüsenhaare finden sich bei Vertretern der verschiedensten Pflanzenfamilien an bestimmten Teilen ihrer oberirdischen Organe. Sie bestehen in der Regel aus einer oder mehreren Köpfchenzellen und einer Reihe von Stielzellen. Die Köpfchen sind als die Produzenten der Sekrete anzusehen. Sie enthalten außer ätherischen Ölen und Harzen noch Balsame und Lipoide. Die Sekrete stellen die Endprodukte noch unbekannter Stoffwechselfunktionen dar und sind der Nomenklatur FREY-WYSSLINGS (1935) zufolge als *Exkrete* zu bezeichnen.

Nach den herrschenden Anschauungen (HANNIG 1930, FREY-WYSSLING 1935 u. a.) werden die Exkrete im Protoplasma gebildet — vielleicht unter Mitwirkung von Chondriosomen (TRIEBEL 1934) oder Kernsubstanzen (ZIEGENSPECK und POSTELMANN 1930) — und dann durch die Membran nach außen befördert. Die über die Köpfchenzelle gespannte Cuticula hindert die Exkrete am Durchtritt, so daß jene sich zwischen Zellwand und Cuticula ansammeln und diese abheben. Verschiedene Beobachtungen (z. B. TRAPP 1949) scheinen aber darauf hinzudeuten, daß die Anhebung der Cuticula nicht allein durch den Druck der sich ansammelnden Exkrete erfolgt, sondern wenigstens zum Teil seine Ursache im besonderen Bau der Membran des Drüsenköpfchens zu suchen ist. Nach den Beobachtungen von TRAPP 1949 u. a. soll sich eine stark quellbare, pektinreiche Substanz unter der Cuticula befinden, die Raum schafft für die Einlagerung der Exkrete.

Es soll die Aufgabe der vorliegenden Mitteilung sein, durch Anwendung der polarisationsoptischen Methode unsere Kenntnisse vom Bau und der Funktion der pflanzlichen Drüsenhaare zu ergänzen.

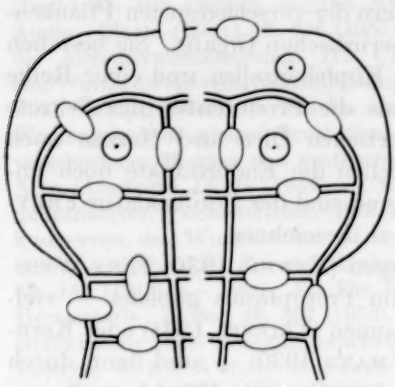
Eigene Untersuchungen

Zur Untersuchung gelangten die Drüsenhaare von Blatt und Blüte der unten angeführten Pflanzen als Frischpräparate in Wasser. Es zeigte sich, daß die Drüsenhaare von *Matricaria chamomilla* andere Ergebnisse lieferten als diejenigen von anderen Pflanzenarten, so daß es sich empfiehlt, beide Gruppen gesondert zu betrachten.

1. Matricaria chamomilla. Die Drüsenköpfchen der echten Kamille mit abgehobener Cuticula, d. h. bei bedeutender Exkretion, zeigen ver-

hältnismäßig starke Doppelbrechung. Sowohl der optische Schnitt durch die Zellwand als auch die abgehobene Cuticula sind optisch anisotrop. In Blickrichtung senkrecht zur Wandfläche („Membranaufsicht") beobachtet man nur schwache Doppelbrechungserscheinungen gegen den Rand des Köpfchens hin, die Mitte der Membranaufsicht ist isotrop.

Das relative Vorzeichen der Doppelbrechung kann mit Hilfe der Gipsplatte Rot I. Ordnung in 45°-Stellung oder bei schwächerer Doppelbrechung in einer Stellung, bei der die Richtung des größeren Brechungsindex der Gipsplatte nur wenige Grade von der Schwingungsrichtung des Polarisators abweicht (LAVES und ERNST 1943), bestimmt werden. Sehr geringe Doppelbrechung ermittelt man mit Hilfe der Viertelwellenlängenplatte aus Glimmer.



a b

Abb. 1a u. b. Drüsenhaar von *Matricaria* mit eingezeichneten Indexellipsen. a Cuticula negativ, Zellulosewände teils negativ, teils positiv. b Dasselbe nach Extraktion mit Chloroform

Wendet man eine dieser bekannten Methoden auf die vorliegenden Objekte an, so stellt man fest, daß die Cuticula und ein Teil der Zellwände des Drüsenhaares negative Doppelbrechung in bezug auf die Tangente an das Köpfchen aufweisen. In den folgenden Zeilen wird das relative Vorzeichen auf diese Richtung bezogen, falls nicht andere Angaben gemacht werden. Um Spiegelungen zu vermeiden, empfiehlt es sich, die Beobachtung auch in Glycerin vorzunehmen. Die Doppelbrechungserscheinungen sind darin bedeutend besser wahrzunehmen, das Vorzeichen wird aber nicht verändert. Die Querwände der Zellen sind positiv doppelbrechend in bezug auf den Verlauf des optischen Schnittes (vgl. Abb. 1a), desgleichen die Längswände dieser Zellen. Wand und Cuticula zeigen Isotropie, wenn man senkrecht auf ihre Fläche blickt.

Läßt man zu dem Präparat Alkohol fließen, so ändert sich die Doppelbrechung nicht. Auch Aceton läßt das ursprüngliche Vorzeichen bestehen. Chloroform dagegen wirkt (nach vorheriger Alkoholbehandlung) nach sehr kurzer Zeit derart ein, daß das Exkret im subcuticulären Raum gelöst und die Cuticularblase ganz plötzlich faltig wird und zusammensinkt. Das Vorzeichen der vorher negativ doppelbrechenden Zellwandquerschnitte wechselt, das der vorher positiven bleibt bestehen (Abb. 1b).

Die Frage, ob der Vorzeichenwechsel durch Herauslösen einer optisch wirksamen Substanz erfolgt ist, oder durch Änderung des Brechungs-

index bei der Imbibition durch das Chloroform läßt sich entscheiden, wenn man die alten Bedingungen wiederherzustellen versucht und nach kurzem Spülen mit Alkohol wieder Wasser zusetzt. Es läßt sich dabei aber kein erneuter Vorzeichenwechsel beobachten. Das Chloroform muß also eine lipoide Substanz gelöst haben, die der Cuticula und manchen Zellwänden das negative Vorzeichen erteilt hat. Beim Imbibieren mit Flüssigkeiten von steigendem Brechungsindex (Wasser, Alkohol, Chloroform, Glycerin) steigt die Doppelbrechung der Cuticula und der Wand deutlich an, ohne aber, wie schon betont, den optischen Charakter zu wechseln. Diese Substanzen dringen anscheinend in die vom Lipoid frei gemachten Lücken der Cuticula und der Wand ein und bilden hier mit den Membransubstanzen Wienersche Mischkörper.

Ein solcher Mischkörper mit positiver Doppelbrechung kann nur zustande kommen, wenn die Membranlücken tangential angeordnet sind. Sie sind im unbehandelten Drüsenköpfchen von einer chloroformlöslichen Substanz erfüllt, deren größerer Brechungsindex radial verläuft. In der Membranaufsicht blickt man in die Richtung der optischen Achse und stellt daher Isotropie fest.

Die positive Restdoppelbrechung der extrahierten Cuticula deutet auf einen gewissen Gehalt an Cellulose hin, denn Cutin ist nach allen bisherigen Ergebnissen optisch isotrop (Frey-Wyssling 1953). Cellulose hat man nicht in der Cuticula, wohl aber in cutinisierten Zellwänden bereits nachgewiesen (Meyer 1938, Roelofsen 1952). Man dürfte also bei den Drüsenhaaren streng genommen nicht von einer Cuticula im engeren Sinn sprechen, sondern von einer cutinisierten Zellwand.

Somit unterscheidet sich die Cuticula der Drüsenköpfchen in ihrem Bau nicht wesentlich von dem cutinisierter Zellwände. Lediglich das Vorkommen von leicht löslichen Lipoiden scheint bemerkenswert. Im allgemeinen sind nämlich die Lipoide der cutinisierten Zellwände nicht ohne weiteres mit Lösungsmitteln leicht zu entfernen (vgl. Roelofsen 1952, Freytag 1954). Weiterhin auffallend ist der hohe Gehalt der Zellwände an Lipoid. Gerade diejenigen Zellwände, welche der Exkretblase angrenzen, sind besonders reich daran. Die Vermutung liegt nahe, daß die Zellwandlipoide einen Teil des Exkrets darstellen und mit Hilfe des polarisierten Lichtes bei dem Durchwandern der Zellwand mikroskopisch beobachtet werden können. In den Micellarlücken erscheinen sie geordnet, in der Exkretblase aber regellos verteilt und daher isotrop. Aus diesem Grunde sind auch Exkrettröpfchen oder -vorstufen im Zellumen polarisationsoptisch nicht nachweisbar.

2. Drüsenhaare anderer Pflanzen. Die Befunde bei den Drüsenhaaren anderer Pflanzenarten stimmen weitgehend überein, so daß sie hier — unter Hinweis auf etwaige Abweichungen — gemeinsam betrachtet werden können. Untersucht wurden die Drüsenköpfchen von *Pelargonium*,

Pulmonaria officinalis, *Geranium molle* und *robertianum*, *Lamium album*, *Ajuga reptans*, *Melandrium rubrum* und *Veronica chamaedrys*.

Auch bei diesen Arten erweist sich die Zellwand und Cuticula als doppelbrechend. Überraschenderweise erscheint aber hier in Zellwand und Cuticula in den meisten Fällen positives Vorzeichen! (Abb. 2). Bei wenigen Exemplaren von *Lamium album* erschien die Zellwand positiv, die Cuticula negativ, aber auch umgekehrte Vorzeichen konnten zuweilen beobachtet werden. Bei einigen Zellen von *Geranium robertianum* erschien die Wand positiv mit Stellen von negativer Doppelbrechung in bezug auf die Tangente an das Haar. Die Membranaufsicht ist ohne Doppelbrechung, wenn man von den Stellen absieht, in der die Blickrichtung nicht senkrecht auf die Wand fällt, sondern diese schräg trifft (Randbezirke). In diesen Regionen erkennt man das Vorzeichen des optischen Schnittes.

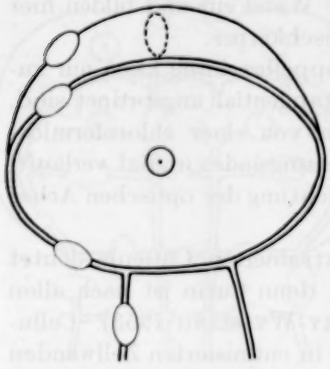


Abb. 2. *Lamium album*. Cuticula und Membran sind positiv doppelbrechend

Legt man die Drüsenhaare in Alkohol, so verschwinden die negativen Anteile von Cuticula und Zellwand in wenigen Minuten. Durch Zugabe von Wasser läßt sich das vorherige Vorzeichen nicht zurückerhalten. Man muß deshalb auch hier annehmen, daß eine Substanz die Cuticula und die Zellwand (stellenweise) inkrustiert, welche die negative Doppelbrechung hervorruft, im Gegensatz zu den im vorigen Abschnitt besprochenen Drüsenköpfchen aber schon in Alkohol sich löst. Freilich ist ihre Doppelbrechung viel schwächer, d. h. die lipoide Substanz ist nur in geringerem Maße vorhanden und nur in wenigen Exemplaren mit Hilfe des Polarisationsmikroskops am negativen Vorzeichen erkennbar.

Der Feinbau der Cuticula ist in dieser Gruppe von Pflanzen mit Drüsenzellen noch stärker unterschieden von den Verhältnissen, die man bei cutinisierten Membranen nichtdrüsiger Zellen gefunden hat. Während dort das negative Vorzeichen des optischen Schnittes die Regel ist, findet man bei den Drüsenhaaren positive Doppelbrechung als Regel-, negative Anisotropie aber als Sonderfall. Das bedeutet, daß die Cuticula entweder kein oder so wenig Lipoid enthält, daß die positive Doppelbrechung der Zellulose nicht überkompensiert werden kann. Die Cuticula wäre auch hier richtiger als cutinisierte Membran zu bezeichnen.

Der Feinbau der Cellulosewand entspricht dem allgemeinen Schema bei isodiametrischen Zellen: Die Cellulosemicellen verlaufen ihrer Optik zufolge tangential, in der Fläche aber ohne Orientierung. Sie bilden also eine Folie.

Auch die *Exkrete* zeigen manchmal deutlich Doppelbrechungserscheinungen. Die Richtung des größeren Brechungsindex liegt dabei im optischen Schnitt durch eine Exkretblase senkrecht zur Tangente an die Zellwand, das Vorzeichen ist also als negativ zu der hier gewählten Bezugsrichtung zu bezeichnen. Je schmäler der mit Exkret angefüllte Raum erscheint, desto stärker ist gewöhnlich die Doppelbrechung (Abb. 3). Bei größeren subcuticulären Räumen kann die Doppelbrechung — wenn überhaupt — nur noch mit der Viertelwellenlängenplatte ermittelt werden. In Alkohol löst sich das Exkret und die Doppelbrechung verschwindet. Es ist auch hier wahrscheinlich, daß die doppelbrechenden Anteile des Exkretes und die alkohollöslichen Substanzen in der Zellwand und Cuticula identisch sind.

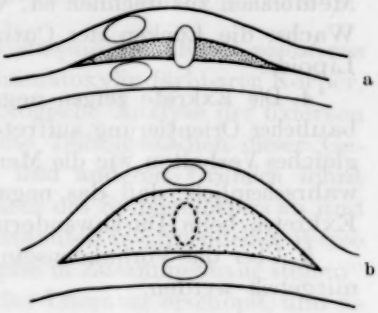


Abb. 3. Starke Doppelbrechung bei schmalen (a) und schwache Doppelbrechung bei breiten exkreterfüllten Subcuticularräumen (b)

Die Tatsache, daß schmale subcuticulare Räume starke, breite aber nur geringe Doppelbrechung zeigen, deutet darauf hin, daß die Stärke der optischen Anisotropie von dem Orientierungsgrad der Lipoidmolekeln abhängig ist. Am besten ist die Orientierung in den intermicellaren Räumen der Zellwand selbst. Daraus erklärt sich die relativ starke Doppelbrechung an jenen Stellen der Zellwand, in denen die Exkrete eingelagert sind. Auch hier gestattet es die als sehr empfindlich bekannte polarisationsoptische Methode, die Exkrete beim Durchtritt durch die Zellwand zu beobachten.

Bezüglich des Vorkommens von *Pektin*, das einige Autoren mit Hilfe von Farbstoffen nachgewiesen haben (vgl. die Literatur bei Trapp 1949), können hier keine weiteren Aussagen gemacht werden, weil das Pektin in der pflanzlichen Zellwand infolge seiner Lagerung durchweg statistische Isotropie erkennen läßt (Frey-Wyssling 1935), deutlichere isotrope Zonen aber bei den untersuchten Objekten nicht in Erscheinung traten. Vergleicht man die geschilderten Verhältnisse mit den Befunden an den cutinisierten Zellwänden anderer Pflanzen (Anderson 1928), so erscheint das Vorkommen von Pektin zwischen Cellulosewand und cutinreicher Schicht gar nicht so abwegig.

Zusammenfassung

1. Zellwand und Cuticula der Drüsenköpfchen sind doppelbrechend, bei manchen Objekten ist auch Doppelbrechung des Exkrets nachzuweisen. Während bei *Matricaria* die Cuticula negativ, die Zellwände zum Teil negativ, zum Teil positiv doppelbrechend in bezug auf die

Tangente an das Köpfchen erscheinen, findet man bei anderen Objekten optisch positive Cuticulen und Zellwände.

2. Durch Behandlung mit Alkohol oder Chloroform lassen sich bei allen Teilen der Drüsenzelle positive Vorzeichen erzeugen. Durch diese Behandlung wird eine lipoide Substanz aus Cuticula und Zellwand herausgelöst.

3. Im Vergleich mit den Vorstellungen vom Feinbau der Zellwand und Cuticula bei nichtdrüsigen Organen wird festgestellt, daß die Cuticula der Drüsenköpfchen Cellulose enthält, diese also den cutinisierten Membranen zuzurechnen ist, weiterhin, daß nicht schwer extrahierbare Wachse die Lücken der Cuticula inkrustieren, sondern leicht lösliche Lipoide.

4. Die Exkrete zeigen negative Doppelbrechung, wenn sie in feinbaulicher Orientierung auftreten. Sie zeigen gegenüber Lösungsmitteln gleiches Verhalten wie die Membranlipoide der Drüsenköpfchen. Es ist wahrscheinlich, daß das negative Vorzeichen der Membran von den Exkreten beim Durchwandern verursacht wird.

5. Über das Vorhandensein von Pektin können keine neuen Befunde mitgeteilt werden.

Literatur

ANDERSON, D. B.: Struktur und Chemismus der Epidermisaußenwände von Clivia nobilis. Jb. wiss. Bot. **69**, 501 (1928). — FREYTAG, K.: Zum Feinbau kutinisierter Zellwände. Ber. oberhess. Ges. Natur- u. Heilkd., Naturwiss. Abt., N. F. **26**, 21 (1954). — FREY-WYSSLING, A.: Die Stoffausscheidung der höheren Pflanzen. Berlin 1935. — Submicroscopic morphology of protoplasm. Amsterdam, Houston, London u. New York 1953. — HANNIG, E.: Über den Mechanismus der Sekretausscheidung bei den Drüsenhaaren von Pelargonium. Z. Bot. **23**, 1004 (1930). — LAVES, F., u. TH. ERNST: Die Sichtbarmachung des Charakters äußerst schwacher Doppelbrechungseffekte. Naturwiss. **31**, 68 (1943). — MEYER, M.: Die submikroskopische Struktur der kutinisierten Zellmembranen. Protoplasma (Berl.) **29**, 552 (1938). — ROELOFSEN, P. A.: On the submicroscopic structure of cuticular cell walls. Acta bot. neerl. **1**, 99 (1952). — TRAPP, I.: Neue Untersuchungen über Bau und Tätigkeit pflanzlicher Drüsenhaare. Ber. oberhess. Ges. Natur- u. Heilk., Naturwiss. Abt., N. F. **24**, 182 (1949). — TRIEBEL, TH.: Untersuchungen über die Sekretbildung in pflanzlichen Drüsenzellen. Diss. Braunschweig 1934. — ZIEGENSPECK, H., u. L. POSTELMANN: Die Sekretbildung in den Drüsenköpfchen des Kutikularbeuteltypus der pflanzlichen Drüsenhaare. Protoplasma (Berl.) **11**, 298 (1930).

Dr. K. FREYTAG, Treysa, Bez. Kassel, Karl-Ludwig-Straße 9

Planta, Bd. 50, S. 47—59 (1957)

Aus dem Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Knöll)

DER SPITZENKÖRPER VON POLYSTICTUS VERSICOLOR (L.)

Von
Manfred Girbardt

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Juni 1957)

In den Hyphenspitzen von *Coprinus sterquilinus* und *C. narcoticus* findet Brunswik (1924) einen mit Eisenhämatoxylin färbbaren Körper, den er „Spitzenkörper" nennt. Die cytologische Analyse der fixierten und gefärbten Präparate ergab, daß keine Teilungsstadien dieser Gebilde zu beobachten sind. Aus diesen und anderen Gründen lehnt Brunswik die zunächst erörterte Kernnatur des Spitzenkörpers ab und kommt zu dem Schluß, daß dieser Zellbestandteil in „irgendeiner Weise mit dem apikalen Wachstum der Endhyphe in Zusammenhang stehen" müsse. Damit scheinen die Angaben in der Literatur erschöpft, und es erweckt den Eindruck, als sei der Spitzenkörper eine isoliert stehende Erscheinung, beschränkt auf die Hyphen der beiden *Coprinus*-Arten.

Im Phasenkontrast-Lebendbild ist der Spitzenkörper deutlich zu sehen (Girbardt 1955a) und konnte bei mehreren Basidiomyceten, sowie bei *Penicillium* und *Aspergillus* nachgewiesen werden. Es soll Aufgabe vorliegender Arbeit sein, weitere Beiträge zur Kenntnis dieses eigenartigen Körpers zu liefern. Mit der Beschreibung seines Verhaltens unter normalen und experimentellen Bedingungen soll gleichzeitig unser Wissen um die Pilzzelle, die einen so ausgezeichneten Einblick in das lebendige Zellgeschehen gewährt, erweitert werden.

Material und Methodik

Untersucht wurde das in künstlicher Kultur auf festem Substrat gewachsene vegetative Mycel verschiedener Basidiomyceten. Das Hauptuntersuchungsobjekt, *Polystictus versicolor* (L), war der gleiche Stamm wie in früheren Arbeiten (Girbardt 1955a). Die übrigen Stämme stellte freundlicherweise das Institut für spezielle Botanik der Universität Jena zur Verfügung, wofür ich auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. O. Schwarz vielmals danken möchte.

Eine wesentliche Verbesserung des Phasenkontrastbildes brachte die Verwendung eines Substrates, dessen Brechungsindex dem des Hyphenplasmas angeglichen ist (Barer 1954; Zusammenfassung der Literatur Haselmann 1957). Zu diesem Zweck wurde für die Objektträgerkultur (Girbardt 1956a) Gelatine als Verfestigungsmittel verwendet, wie von Müller (1956) für Hefen und Mason (1956) für Bakterien angegeben. Als optimal erwies sich ein Nährmedium (4% Malzextrakt (Liebe, Dresden), 0,5% Witte-Pepton 43), mit 14—16% geklärter Gelatine ($n_D \sim 1{,}360$).

Um Verwacklungsunschärfen bei den photographischen Aufnahmen zu vermeiden, die bei den notwendigen kurzen Belichtungszeiten auftreten (BERGNER 1956), wurde in Verbindung mit dem Miflex-Kleinbild-Aufsatz eine Kamera mit Sektorenverschluß (Robot) gewählt. Diese Kamera ermöglicht gleichzeitig durch ihren mechanischen Filmtransport eine rasche Aufnahmefolge (je 2 Sekunden ein Bild).

Filmmaterial: Agfa-Isopan-Film 17/10 Din.

Belichtungszeit: $^1/_5$—$^1/_2$ sec.

Lichtquelle: Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 500, Kühlküvette, Schott-Filter VG 9, NG 3.

Optische Daten: Zeiss Phako (Stativ LuWdE, Objektiv Ph/HI/90, Ap. 1,25 bzw. Ph 10, Ap. 0,30, Kompensationsokular 15× bzw. Projektiv 6,3).

Bebrütungstemperatur: 21—22°, Bebrütungsdauer: 2—3 Tage.

Besondere Versuchsanordnungen sind in den einzelnen Abschnitten beschrieben. Die wachsende Spitze liegt in allen Abbildungen rechts.

A. Vorkommen des Spitzenkörpers

Zunächst soll an Hand phasenoptischer Lebenduntersuchungen geprüft werden, ob außer den bereits früher untersuchten Arten noch weitere Basidiomyceten einen Spitzenkörper besitzen. Das Ergebnis der Untersuchungen zeigt Tabelle 1. Es ist aus der Tabelle ersichtlich, daß der Besitz eines Spitzenkörpers nicht an die systematische Stellung der Art gebunden ist. Es ist ferner für sein Vorhandensein gleichgültig, ob die Hyphenzelle einen, zwei oder mehrere Kerne besitzt. Er findet sich sowohl in schnallentragenden wie schnallenlosen Mycelien. Danach scheint es, als sei der Spitzenkörper zumindest bei Hymenomyceten allgemein verbreitet.

Der Lebendnachweis des Spitzenkörpers scheitert, wenn nicht *wachsende* Hyphen längere Zeit mikroskopisch beobachtet werden können. Wie später zu zeigen sein wird, ist der Spitzenkörper einer der empfindlichsten Bestandteile der Zelle und verschwindet bei den geringsten Störungen. Darauf mag es zurückzuführen sein, daß bei *Phallus impudicus*, der auf Gelatine sehr geringes, strangförmiges Wachstum zeigt, kein Spitzenkörper zu finden war. Es gelang hier nicht, *wachsende* Spitzen nach Deckglasauflage zu beobachten.

B. Das Verhalten des Spitzenkörpers bei Krümmungen

Die Untersuchung der Haupthyphenspitze mit Hilfe des Zeitrafferfilmes lehrt, daß der Spitzenkörper im Plasma der Spitze beweglich ist. Mit den fädigen Elementen (Chondriosomen?) scheint er in dauernder Verbindung zu stehen. Solange die Hyphe gerade wächst, liegt er zentrisch; er verändert seine Lage, sobald Krümmungen der Hyphe auftreten.

Bei den Krümmungen von *Polystictus* wird eine Flanke der Hyphe im Wachstum gefördert, während gleichzeitig die gegenüberliegende Seite der Hyphe langsamer wächst. Treten extreme Krümmungen auf, so kann eine Flanke vorübergehend ihr Wachstum völlig einstellen.

Tabelle 1

Lfd. Nr.	Art	Anzahl der Kerne je Zelle	Schnallen	Spitzenkörper
1	*Agaricus arvensis* Schff. ex Fr.	viele	—	+
2	*Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc	2	—	+
3	*Agaricus campestris* (L.) Fr.	sehr viele	—	+
4	*Amanita strobiliformis* (Vitt.) Quél.	1	—	+
5	*Coprinus atramentarius* (Bull. ex Fr.) Fr.	2	+	+
6	*Coprinus domesticus* (Pers.) Fr.	viele	—	+
7	*Coprinus micaceus* (Bull. ex Fr.) Fr.	viele	—	+
8	*Coprinus similis* Berk. et Br.	viele	—	+
9	*Crucibulum vulgare* Tul	2	+	+
10	*Cyathus olla* (Batsch) Pers.	2	+	+
11	*Exidia glandulosa* Fr.	1	—	+
12	*Flammulina velutipes* Sing.	2	+	+
13	*Fomes annosus* (Fr.) Cooke	viele	+	+
14	*Fomes fomentarius* (L.) Kick	1	—	+
15	*Fomes marginattus* (Fr.) Gillet	2	+	+
16	*Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.	2	+	+
17	*Gloeoporus adustus* (Willd.) Pilat	2	+	+
18	*Gloeoporus fumosus* (Pers.) Pilat	2	+	+
19	*Grifola sulfurea* (Bull.) Pilat	viele	—	+
20	*Grifola umbellata* (Pers.) Pilat	2	+	+
21	*Gymnopilus spectabilis* (Fr.) Sing	viele	—	+
22	*Hohenbuehelia serotina* (Schrad. ex Fr. Sing.)	viele	—	+
23	*Inonotus hispidus* (Bull.) Karst.	viele	—	+
24	*Lactarius volemus* Fr.	2	+	+
25	*Lepista nuda* (Bull. ex Fr.) Smith	2	+	+
26	*Marasmius androsaceus* (L. ex Fr.) Bours.	2	+	+
27	*Mucidula mucida* (Schrad. ex Fr.) Bours.	2	+	+
28	*Naematoloma fasciculare* (Huds. ex Fr.) Karst.	2	+	+
29	*Phallus impudicus* (L.) Pers.	2	+	?
30	*Pholiota squarrosa* (Pers. ex Fr.) Quél.	viele	+	+
31	*Pleurotus ostreatus* (Sarq. ex Fr.) Quél.	2	+	+
32	*Polyporellus brumalis* (Pers.) Karst.	1	—	+
33	*Psathyrella hydrophila* (Bull. ex Fr.)	2	+	+
34	*Stereum hirsutum* Willd.	viele	+[1]	+
35	*Trametes gibbosa*	2	+	+

[1] = Schnallenwirtel (2—5 Schnallen).

Neben den zufälligen, meist schwachen Krümmungen der Spitze von *Polystictus versicolor* treten unter besonderen Bedingungen und an bestimmten Stellen regelmäßig stärkere Krümmungen und damit gut beobachtbare Verlagerungen des Spitzenkörpers auf.

1. Deckglasauflage. Solange das Mycel auf dem Gelatinefilm des Objektträger in der feuchten Kammer wächst, liegen zumindest die vorderen Haupthyphen in der obersten Schicht des Nährbodens und wachsen parallel der Oberfläche. Dabei sind sie nicht der Oberfläche aufgelagert, sondern zu etwa $^4/_5$ des Hyphendurchmessers in die oberste Schicht eingebettet.

Man kann sich von dieser „Einbettung" durch genaues Fokussieren überzeugen. Zieht man die Hyphen vorsichtig mit einer Mikromanipulatornadel zurück, so bleiben in der Gelatineoberfläche die Vertiefungen der Hyphen sichtbar, die an Fraßgänge der Larven holzzerstörender Insekten erinnern.

Wird das Deckglas aufgelegt, so wachsen nach kurzer Unterbrechung die meisten Hyphen nicht mehr parallel der Oberfläche weiter, sondern dringen in die Gelatine ein. Der Spitzenkörper jeder Hyphe liegt dabei kurze Zeit exzentrisch in der dem Deckglas abgekehrten Seite der Spitze. Er rückt dann sofort wieder ins Zentrum, so daß die eingeschlagene neue Wachstumsrichtung schräg zur Oberfläche in der Folgezeit ziemlich konstant beibehalten wird.

Vereinzelt treten nach einiger Zeit entgegengesetzte Krümmungen auf, so daß die Hyphen dann in der Gelatine mehr oder weniger parallel der Oberfläche wachsen. (Dieses Einwachsen in das Nährsubstrat erschwert die mikroskopische Beobachtung, da nur die unmittelbar in der Oberfläche liegenden Hyphenteile ein optimales phasenoptisches Bild ergeben, wie es für die exakte cytologische Lebendanalyse notwendig ist.)

Sehr selten wachsen Hyphenspitzen auch nach der Deckglasauflage in der obersten Schicht der Gelatine weiter. Diese sind dann zum Studium des Spitzenkörpers besonders geeignet. Häufig findet man jedoch im ganzen Präparat nicht eine solche Hyphe.

Es ist naheliegend, aus dem Verhalten des Spitzenkörpers bei Krümmungen zu folgern, daß ihm eine Art Statolithen-Funktion zukommt. Er entspräche damit dem Glanzkörperchen in den Rhizoiden von Chara (BUDER 1946). In diesem Zusammenhang wurde versucht, die äußeren Faktoren zu ermitteln, die zu einer Verlagerung des Spitzenkörpers führen.

Der Druck des Deckglases könnte eine einseitige mechanische Reizung hervorrufen. — Hierzu wurden in feuchter Kammer wachsende Hyphen mit einer feinen Mikromanipulatornadel (GIRBARDT 1955 b) an verschiedenen Stellen gereizt. Eine sichtbare Reaktion blieb aus.

Die aus dem Dunkeln kommenden Kulturen werden bei der mikroskopischen Beobachtung einseitig von unten bestrahlt, die Hyphen könnten positiv phototropisch reagieren. Zur Prüfung wurden die Objektträger mit dem Deckglas nach unten auf das Mikroskop gelegt. Die Hyphen wuchsen trotzdem in die Gelatine ein, in diesem Falle also der Lichtseite abgewandt. Gleichzeitig wuchsen sie dabei entgegen der wirksamen Schwerkraft, so daß auch dieser Faktor ausgeschaltet werden konnte. Andere Versuche bestätigten, daß die Spitzenkörperverlagerung keine Reaktion auf den einseitigen Lichtreiz sein kann.

Bei der Deckglasauflage dient das Quetsch- bzw. Kondenswasser, das sich als Film auf der Oberfläche der Gelatine befindet, als Einbettungsmedium. Daher ist die dem Deckglas zugekehrte, aus der Gelatine herausragende Flanke der Hyphe möglicherweise anderen osmotischen Kräften oder unterschiedlichen Nährsalzkonzentrationen ausgesetzt. Diese

Möglichkeit wurde mit Versuchsanordnungen geprüft, wie sie FISCHER und WERNER (1956) angeben. Die dabei getesteten Substanzen (Saccharose, NaCl, KNO_3 in verschiedenen Konzentrationen; unterschiedliche Nährsalze oder Nährsalzgemische) erwiesen sich sämtlich als unfähig, eine Spitzenkörperverlagerung zu induzieren. Damit konnte gleichzeitig die von FISCHER und WERNER für *Polystictus versicolor* festgestellte chemotropische Unempfindlichkeit bestätigt werden.

Die Möglichkeit, daß unterschiedliche Sauerstoffversorgung der Hyphenflanken als auslösender Reiz in Frage kommt, ließ sich vorläufig nicht experimentell prüfen.

2. Schnalle. Der Schnallenauswuchs besitzt während der Dauer seines Wachstums einen Spitzenkörper. Wenn der Auswuchs als winziger Höcker sichtbar wird, liegt der Spitzenkörper fast genau zentral (Abb. 1 a), rückt aber sehr bald in eine exzentrische Lage (Abb. 1 b). Zahlreiche Teilbildanalysen von Zeitrafferfilmen lassen es wahrscheinlich werden, daß diese Ortsveränderung erfolgt, *ehe* eine Flanke des Schnallenauswuchses im Wachstum gefördert ist. Es darf daher angenommen werden, daß die *Krümmung eine Folge der Spitzenkörperverschiebung* ist und nicht umgekehrt der Spitzenkörper durch das einseitige Wachstum verlagert wird.

Abb. 1 c und d zeigen, daß bei der weiteren Entwicklung die dem Spitzenkörper abgewandte Flanke stark im Wachstum gefördert ist. Wenige Zeit später rückt der Spitzenkörper wieder ins Zentrum der Schnallenspitze (Abb. 1 e). Während dieser Zeit wächst der Schnallenauswuchs parallel der Haupthyphe (Abb. 1 f). Schließlich gibt der Spitzenkörper seine zentrische Lage wieder auf und wandert an die der Haupthyphe

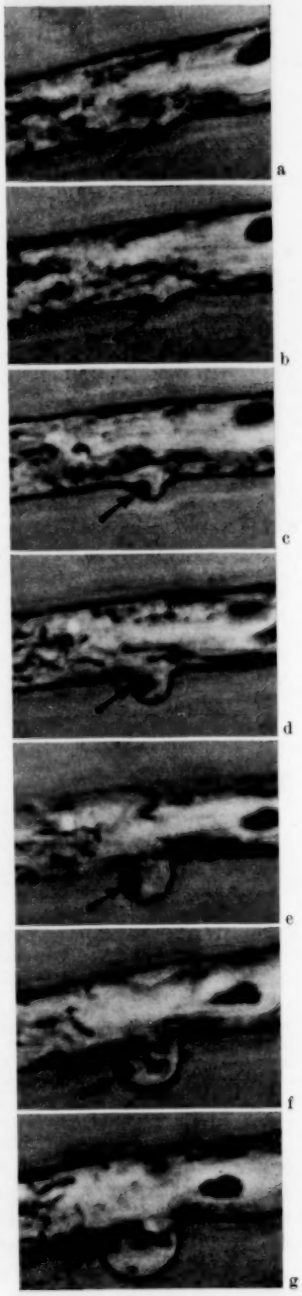


Abb. 1 a—g. Verlagerung des Spitzenkörpers während der Bildung des Schnallenauswuchses von *Polystictus versicolor*. Der Pfeil kennzeichnet die Lage des Spitzenkörpers. Phako lebend; 2000 : 1

zugekehrte Flanke (1g), so daß die Schnalle sich nun erneut krümmt, bis nach unterschiedlich langer Zeit der Spitzenkörper verschwindet und die Schnalle ihr Wachstum einstellt.

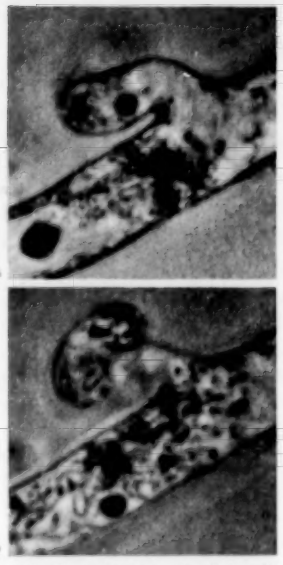


Abb. 2 a u. b. Anomale Schnalle mit schraubigem Wachstum bei *Polystictus versicolor*. a und b zeigen die gleiche Schnalle in verschiedenen optischen Ebenen. Aufnahme b ist etwa 2 min später als a aufgenommen worden. Phako lebend; 2000:1

Der Wachstumsstillstand erfolgt meist, wenn die Schnallenspitze die Haupthyphe wieder erreicht hat. Der Spitzenkörper kann aber in Ausnahmefällen auch länger erhalten bleiben. Behält er dabei seine exzentrische Lage bei, so kommt es zu schraubigem Wachstum. Es entstehen dabei anomale Schnallen, die einem gewundenen Ascogen ähnlich sehen (Abb. 2a und b).

Behält der Spitzenkörper seine zentrische Lage in der Phase, in der er der Haupthyphe parallel wächst, längere Zeit bei, so entstehen extrem lange Schnallen, die an kleine Nebenhyphen erinnern.

Im Gegensatz zum Spitzenkörper der Haupthyphe wird der des Schnallenauswuchses nicht durch die Deckglasauflage beeinflußt. Die während der Deckglasauflage gerade in Entwicklung befindlichen Schnallen wachsen nicht in die Gelatine hinein.

Sollte die Annahme zu Recht bestehen, daß als Folge der Spitzenkörperverlagerung die Hyphenkrümmung einsetzt, so lag der Versuch nahe, den Spitzenkörper durch Zentrifugieren zu verlagern. Es war dann zu prüfen, ob im Gefolge der Verlagerung eine Änderung der Wachtumsrichtung einsetzen würde.

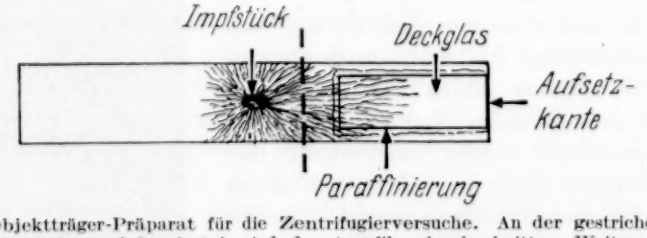


Abb. 3. Objektträger-Präparat für die Zentrifugierversuche. An der gestrichelten Linie zwischen Deckglas und Impfstück wird der Agarfilm durchschnitten. Weitere Erklärung s. Text

Zu diesem Zweck wurden Agar-Objektträger-Kulturen auf längshalbierten Objektträgern in der feuchten Kammer angezüchtet. Die Deckglasauflage (halbierte Deckgläser) erfolgte, wenn die wachsenden Spitzen fast das Ende des Objektträgers erreicht hatten. Dabei muß die Kante des Deckglases genau mit der Schmalseite des Objektträgers abschließen (Abb. 3 „Aufsetzkante").

Der nicht vom Deckglas bedeckte Teil des Agarfilmes wird in etwa 1 cm Entfernung vom Deckglasrand durchschnitten (gestrichelte Linie in Abb. 3) und samt Impfstück vom Objektträger entfernt. Nach etwa 10 min ist der unbedeckte Teil des Agarfilmes fest angetrocknet. Der Deckglasrand kann mit einem Paraffinring umgeben werden. Die bedeckten Hyphenspitzen wachsen normal weiter.

Die Zentrifugenröhrchen müssen entweder eine plane Bodenfläche besitzen oder bei konisch abgeschlossenen muß eine solche plane Fläche geschaffen werden, etwa durch einen passenden Gummistopfen. Auf diese plane Fläche wird die „Aufsetzkante" (Abb. 3) des Objektträgers gestellt. Die wachsende Kultur ist damit vor Verschiebungen während des Zentrifugierens geschützt. Die Zentrifugalkraft wirkt in Richtung der wachsenden Spitze, also entgegengesetzt der Krümmung des Schnallenauswuchses.

Im Experiment wird eine gerade beginnende Schnalle vor der Zentrifugierung markiert (GIRBARDT 1956a). Nach 10 Minuten Zentrifugierung wird die gleiche Schnalle mikroskopisch weiter untersucht.

Die gewonnenen Ergebnisse entsprechen nicht den Erwartungen. Zwar treten interessante morphologische Abweichungen, Kernverlagerungen usw. auf, zu einer Krümmung des Schnallenauswuchses in entgegengesetzter Richtung kam es nicht. Je nach der angewendeten Umdrehungszahl wachsen die Auswüchse normal (1000 U/min) oder bleiben im ersten Entwicklungsstadium stecken (2000 U/min). Die Kernteilung läuft dagegen während der Zentrifugierung mehr oder weniger ungestört ab.

3. Nebenhyphe. Bei *Polystictus versicolor* wächst, wie bei den meisten untersuchten schnallentragenden Basidiomyceten, die Nebenhyphe nach erfolgter Schnallenfusion hinter der Querwand aus. Sie wird vom Plasma des apikalen Pols der subterminalen Zelle gebildet. Dieses „wachstumsfähige" Plasma besitzt einen wesentlich höheren Brechungsindex als der basale Teil der Spitzenzelle (vgl. Abb. 4). Daraus dürfte hervorgehen, daß die

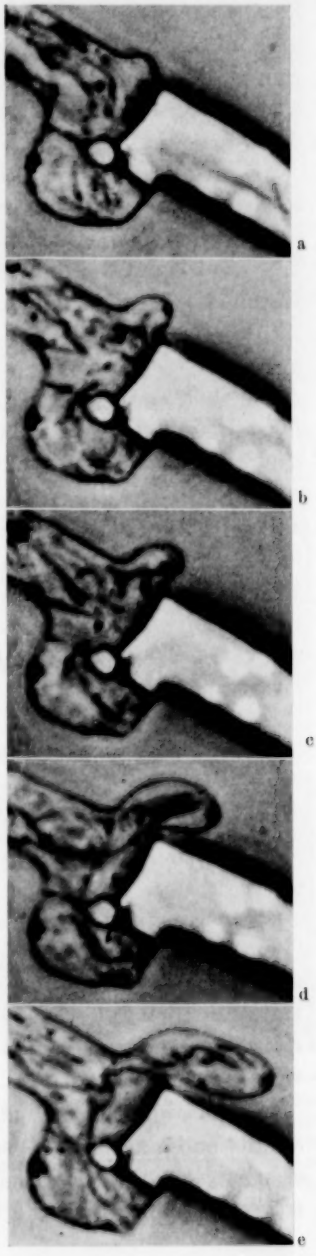


Abb. 4 a—e. Auswachsende Nebenhyphe von *Polystictus versicolor* mit charakteristischer Verlagerung des Spitzenkörpers. Der basale Teil der Spitzenzelle (rechts von der Querwand) gibt, da er einen geringeren Brechungsindex als das umgebende Medium besitzt, negativen Bildkontrast. Phako lebend; 2000:1

apikalen Pole der Zellen einen höheren Anteil an Trockengewichtsubstanz als die basalen Pole besitzen müssen („Polarität" vgl. GIRBARDT 1955a). Submikroskopisch ist das „wachstumsfähige" Plasma anders als das ruhende strukturiert (GIRBARDT 1957).

Wie bei der Schnallenbildung tritt auch beim Auswachsen der Nebenhyphe eine starke Krümmung, jedoch in entgegengesetzter Richtung, auf. Häufig ist hierbei in den ersten Anfängen (Abb. 4a) noch kein Spitzenkörper sichtbar. Er ist jedoch stets wenige Zeit später deutlich zu sehen (Abb. 4b). Voraussetzung ist, daß die Nebenhyphe nicht in ihrer Entwicklung steckenbleibt.

Der Spitzenkörper rückt auch hier von seiner anfänglich zentrischen in eine exzentrische Lage, während die Krümmung stattfindet (Abb. 4b und c). Sobald er die Mitte der wachsenden Spitze wieder eingenommen hat, wächst die Nebenhyphe gerade weiter, meist im spitzen Winkel zur Haupthyphe, gelegentlich ihr auch genau parallel.

Der Spitzenkörper der Nebenhyphe scheint, wie jener des Schnallenauswuchses, nicht oder wesentlich weniger als die Haupthyphenspitze durch die Deckglasauflage beeinflußbar zu sein. Die Nebenhyphe kann daher längere Zeit auch unter dem Deckglas in der obersten Schicht der Gelatine wachsen, vorausgesetzt, daß ihr Beginn in dieser Ebene lag.

Sind die exogenen Reize auf die Spitzenzelle im Falle der Deckglasauflage wahrscheinlich, so dürften sie bei den Spitzenkörperverlagerungen im Schnallenauswuchs und in der Nebenhyphe nicht in Betracht kommen. Welcher Art die endogenen Reize sind, die einmal eine Rückwärtskrümmung und wenige Zeit später an fast der gleichen Stelle der Hyphe die entgegengesetzt gerichtete Krümmung der Nebenhyphe induzieren, bleibt rätselhaft.

C. Das Verhalten des Spitzenkörpers beim Wachstumsstillstand

Es wurde bereits kurz erwähnt, daß unmittelbar nach der Deckglasauflage das Wachstum der Spitze für kurze Zeit sistiert ist. Der Grund für diesen Wachstumsstillstand ist nicht bekannt. Während dieser Zeit besitzt die Spitze keinen Spitzenkörper. Sobald das Wachstum erneut einsetzt (nach 2—3 Minuten), ist er wieder sichtbar.

Experimentell läßt sich eine Wachstumssistierung mit verschiedenen Chemikalien (Narkotica, Gifte, hohe Salzkonzentrationen, Vitalfarbstoffe) herbeiführen. Die Einwirkung all dieser Stoffe führt jedoch fast augenblicklich zu irreversiblen Strukturveränderungen in der Zelle (Plasmaballungen usw.), so daß die Reaktion des Spitzenkörpers nicht lebend verfolgt werden kann.

In Zusammenhang mit mikrokinematographischen Aufnahmen war es notwendig zu prüfen, welche Lichtintensitäten von den Hyphen ohne sichtbare Strukturänderungen und ohne Sistierung des Wachstums ertragen werden. Hierbei erwies sich die Verabreichung hoher Lichtinten-

sitäten als physikalischer Eingriff in das Zellgeschehen, mit dessen Hilfe das Verhalten des Spitzenkörpers sehr gut studiert werden konnte.

Es soll an dieser Stelle nicht auf die sehr reizvolle Frage eingegangen werden, ob einzelne Lichtkomponenten, lokale Temperaturerhöhungen oder andere Faktoren wirksam sind. Auch die quantitative Seite (Reaktionszeit, Erholungsphase) soll hier unberücksichtigt bleiben. Die Untersuchungen zu diesen Fragen sind im Gange und sollen Gegenstand späterer Erörterung sein.

Hier interessiert nur, daß die kurzzeitige Verabfolgung einer großen Lichtmenge zu vorübergehendem Wachstumsstillstand führt.

5 min nach Deckglasauflage wird eine Spitze bei verträglicher Lichtintensität beobachtet. Danach erfolgt ein Abdecken der Lichtquelle (HBO 500) und die Entfernung aller Filter bis auf die Kühlküvette aus dem Strahlengang. Auch die Phasenringblende, die etwa 80% der eingestrahlten Lichtintensität vernichtet, wird ausgeschaltet. Durch Ausschwenken der Abdeckscheibe erhält die auf dem Mikroskoptisch liegende Hyphenspitze für die Dauer von 3 sec das ungefilterte, durch den Kondensor konzentrierte Licht der Quecksilberhöchstdrucklampe. Sofort nach dem erneuten Abdecken der Lichtquelle schaltet man die Filter (VG 9 und NG 3) sowie die Phasenringblende wieder ein. Etwa 10 sec nach dem „Lichtschock" kann die mikroskopische Beobachtung der erfolgten Reaktion bei verträglichem Licht wieder einsetzen.

Den Verlauf eines solchen „Lichtschock"-Versuches zeigt Abb. 5. Bei Abb. 5a wächst die

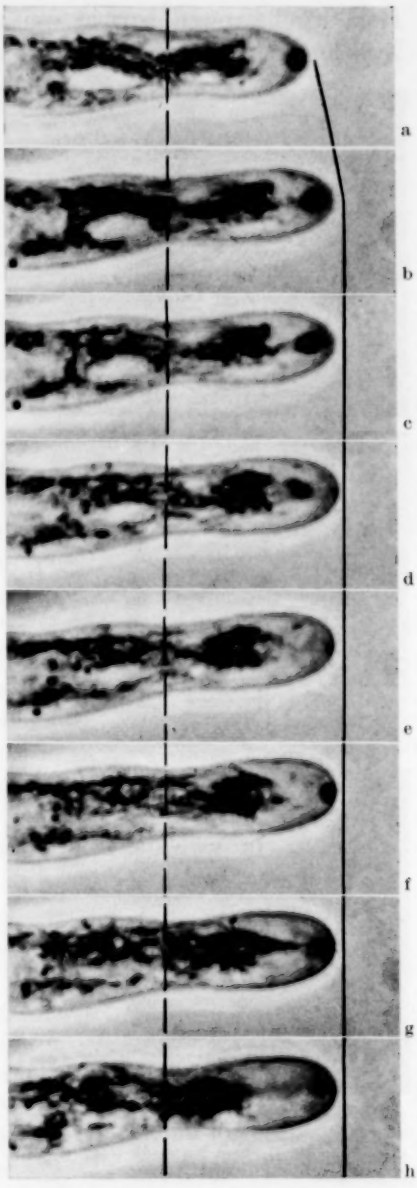


Abb. 5a—h. Reaktion des Spitzenkörpers von *Polystictus versicolor* auf einen „Lichtschock". Die gestrichelte Linie verbindet gleiche Punkte der Hyphe. Die ausgezogene Linie kennzeichnet den Wachstumsstillstand ab Teilbild b. Phako lebend; 2000:1

Haupthyphenspitze normal mit zentrisch liegendem Spitzenkörper. Zwischen Abb. 5a und b hat die Bestrahlung (3 sec) stattgefunden. Die vor den Hyphen gezeichnete Markierungslinie läßt erkennen, daß die Hyphe während der Zeit, die nach der Aufnahme 5a verstrichen ist (etwa 20 sec), noch wächst. Die gestrichelte Linie kennzeichnet eine markante Einschnürung der Hyphe und dient als Beweis, daß die gleichen Hyphenbereiche bei allen Aufnahmen genau senkrecht untereinander liegen.

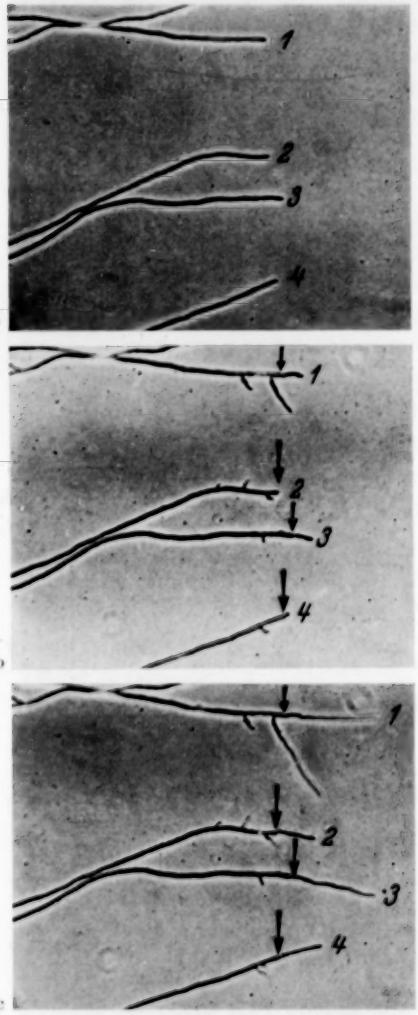


Abb. 6a—c. Reaktion der Hyphenspitzen von *Polystictus versicolor* nach 40 sec Bestrahlung mit intensivem Licht. b ist 100 min, c 150 min nach der Bestrahlung photographiert. Die Pfeile kennzeichnen die Auswuchsstellen der neuen Hyphenspitzen nach dem Wachstumsstillstand. Phako lebend; 140:1

Durchschnittlich 25 sec nach dem Lichtschock löst sich der Spitzenkörper von der Spitze ab und das Wachstum wird eingestellt (Abb. 5b). Diese beiden Vorgänge verlaufen gleichzeitig, so daß sich vorläufig nicht entscheiden läßt, welcher der primäre Prozeß ist. Das Wachstum bleibt nun längere Zeit (5—20 min) sistiert, die Markierungslinie vor den Spitzen verläuft senkrecht.

Aus Abb. 5c—e ist das weitere Schicksal des Spitzenkörpers zu ersehen. Er bewegt sich zunächst immer weiter von der Spitze weg. Dabei wird seine Verbindung mit den Fäden besonders deutlich (Abb. 5c und d). Schließlich verblaßt er im Verlauf weniger Sekunden und ist phasenoptisch nicht mehr sichtbar (Abb. 5e). Die Zeitdauer vom Ablösen bis zum Verschwinden beträgt durchschnittlich 20 sec.

Abb. 5f zeigt einen neuen Spitzenkörper, der kurze Zeit nach dem Verschwinden des alten sichtbar wird. Dieser „Ersatzspitzenkörper" tritt jedoch nicht regelmäßig auf. Auch er fällt innerhalb weniger Sekunden der Auflösung anheim (Abb. 5g, h).

Setzt das Wachstum nach unterschiedlichem Zeitintervall wieder ein, dann liegt der neue Spitzenkörper stark exzentrisch, die Hyphe wächst steil in die Gelatine ein. Diese Phase eignet sich daher nicht zur photographischen Wiedergabe.

Werden die Hyphen längere Zeit (40 sec) der hohen Lichtintensität ausgesetzt, so beginnt erst nach 1—1½ Std das Wachstum wieder. Hierbei verzweigen und gabeln sich fast ausnahmslos die Spitzen. Solche Gabelungen treten normalerweise bei *Polystictus versicolor* sehr selten auf (vgl. GIRBARDT 1956b).

Abb. 6 zeigt den Verlauf eines solchen Versuches, der sich besser auf Agar als auf Gelatine ausführen läßt. In Abb. 6a sind 4 Hyphen vor dem „Lichtschock" sichtbar, Abb. 6b zeigt die gleichen Hyphen 100 min und Abb. 6c 150 min nach der Bestrahlung. Die Pfeile markieren die Stelle, an der sich die Spitze im Augenblick des Schocks befunden hat.

Bei Gabelungen, wie sie vor allem Hyphe 1 zeigt, setzt im allgemeinen eine Spitze ungefähr die Wachstumsrichtung der ursprünglichen Hyphe fort. Der andere Gabelast, der meist etwas später entsteht, wächst in unterschiedlich großem Winkel dazu. Dieser Ast besitzt vom ersten Augenblick seines Entstehens einen zunächst stark exzentrisch liegenden Spitzenkörper, der später wieder ins Zentrum rückt.

In den kleinen Auswüchsen der Hyphen 3 und 4 lassen sich keine Spitzenkörper nachweisen. Das Wachstum solcher „Krüppelhyphen" wird nach kurzer Zeit eingestellt. Ihre Bildung ist keine spezifische Reaktion auf den Lichtreiz, sondern tritt auch im Gefolge andersartiger Störungen auf.

D. Zur Frage der Natur des Spitzenkörpers

Aufschlüsse über die Herkunft des Spitzenkörpers waren zu erwarten bei der Beobachtung seiner Entstehung an Schnallenauswüchsen oder bei wiedereinsetzendem Wachstum. Alle Bemühungen in dieser Richtung blieben jedoch erfolglos. Zwar ist sein „Wachstum", d. h. seine Entwicklung aus einem winzigen Körperchen zur normalen Größe gut verfolgbar, es muß jedoch offen bleiben, ob das anfängliche Körperchen aus der plasmatischen Grundsubstanz entsteht oder ob es ein bereits vorher vorhandenes Granulum darstellt. Möglich ist auch, daß sich der Spitzenkörper durch Aggregation mehrerer Granula bildet. Schließlich sprechen einige Beobachtungen dafür, daß er ein Produkt der fädigen Gebilde (Chrondriosomen) ist und durch Abschnürung ähnlich wie der „Wandkörper" (GIRBARDT 1955a) entsteht.

Die außerordentlich hohe Labilität des Spitzenkörpers macht es unwahrscheinlich, daß es sich um einen toten Inhaltskörper handelt. Auch die bis jetzt vorliegenden elektronenmikroskopischen Befunde sprechen gegen diese Annahme. (Über die Ergebnisse soll an anderer Stelle berichtet werden.)

Es gelang bisher nicht, den Spitzenkörper in fixiertem Zustand spezifisch färberisch darzustellen. Er gibt keine Feulgen-Reaktion. Auch die Versuche, ihn als chondriosomales Gebilde zu charakterisieren, schlugen bislang fehl. Vital reduziert er TTC nicht, obwohl die Hyphen in 0,1%iger Lösung (Phosphatpuffer p_H 4,7) wachsen und der Spitzenkörper phasenoptisch sichtbar ist. Janusgrün B ist selbst in Verdünnungen von 1:100000 so toxisch, daß der Spitzenkörper augenblicklich verschwindet.

E. Schluß

Überblickt man die mitgeteilten Befunde, so zeigt sich, daß der Spitzenkörper als morphologisch distinktes, zu verschiedenen Reaktionen befähigtes Gebildes beschrieben werden kann. Er verschließt sich jedoch bislang beharrlich jeder näheren Charakterisierung. Für weitere Untersuchungen, bei denen die Pilzzelle als Objekt für experimentelle Zellforschung dienen kann, dürfte er das beste „Vitalitätskriterium" sein. Man darf einen experimentellen Eingriff dann als unschädlich für die lebende Hyphenzelle ansehen, wenn der Spitzenkörper dabei erhalten bleibt.

Zusammenfassung

Der in wachsenden Hyphenspitzen sichtbare Spitzenkörper wird bei 35 Basidiomyceten-Arten unterschiedlicher systematischer Zugehörigkeit nachgewiesen. Er tritt sowohl in ein-, zwei- und vielkernigen wie in schnallenlosen und schnallentragenden Zellen auf.

Während der Krümmung von Hyphenspitze und Schnallenauswuchs liegt der Spitzenkörper vorübergehend exzentrisch und scheint die Krümmung zu induzieren. Für die Induktion der Spitzenkörperverlagerung kommen exogene und endogene Faktoren in Betracht. Es gelang bisher nicht, die Reize und ihren Wirkungsmechanismus näher zu charakterisieren.

Bei Wachstumsstillstand, der experimentell durch starke Lichteinwirkung induziert werden kann, löst sich der Spitzenkörper ab, wandert ins Plasma und wird dort aufgelöst. Nach einiger Zeit bildet sich ein neuer Spitzenkörper.

Herkunft und Natur des Spitzenkörpers bleiben ungeklärt.

Da der Spitzenkörper nur in der wachsenden Hyphe vorhanden ist, kann er als Kriterium für das ungestörte Leben der Pilzzelle dienen.

Literatur

BARER, R., and S. JOSEPH: Refractometry of living cells. Quart. J. Microsc. Sci., III. Ser. **95**, 399—423 (1954). — BERGNER, J.: Verwacklungsunschärfen bei der Mikrofotografie mit der Kleinbildkamera. Fototechn. Rdsch. **1**, 21—27 (1956). — BRUNSWIK, H.: Untersuchungen über die Geschlechts- und Kernverhält-

nisse bei der Hymenomycetengattung Coprinus. Goeb. bot. Abh. **1924**, H. 5. — BUDER, K.: Kurze Übersicht über Ergebnisse einiger Arbeiten aus den botanischen Anstalten der Universität Breslau. Maschinenschriftlich 1946. — FISCHER, F. G., u. G. WERNER: Eine Analyse des Chemotropismus einiger Pilze, insbesondere der Saprolegniaceen. Hoppe-Seylers Z. **300**, 211—236 (1955). — GIRBARDT, M.: Lebendbeobachtungen an *Polystictus versicolor*. Flora (Jena) **142**, 540—563 (1955a). — Untersuchungen über die Querwandbildung bei Basidiomyceten. Ber. dtsch. bot. Ges. **68**, 423—434 (1955b). — Eine Methode zum Vergleich lebender mit fixierten Strukturen bei Pilzen. Z. wiss. Mikrosk. **63**, 16—21 (1956a). — Schnallenanomalien bei *Polystictus versicolor* (L). Arch. Mikrobiol. **23**, 413—422 (1956b). — Über die Substruktur von *Polystictus versicolor* (L). Arch. Mikrobiol. **1957**. — HASELMANN, H.: 20 Jahre Phasenkontrast-Mikroskopie. Z. wiss. Mikroskop. **63**, 140—155 (1957). — MASON, D. J., and D. M. POWELSON: Nuclear division as observed in live bacteria by a new technique. J. Bacter. **71**, 474—481 (1956). — MÜLLER, R.: Zur Verbesserung der Phasenkontrast-Mikroskopie durch Verwendung von Medien optimaler Brechungsindices. Mikroskopie (Wien) **11**, 36—46 (1956).

Dr. MANFRED GIRBARDT, Jena,
Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie,
Beuthenbergstr. 11

Planta, Bd. 50, S. 60—106 (1957)

Aus dem Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln-Vogelsang,
Abteilung für Plasmavererbung

GENETISCHE, ENTWICKLUNGSGESCHICHTLICHE UND CYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR PLASMAVERERBUNG

II. Mitteilung

ÜBER EINE PLASTIDENMUTATION MIT INTRACELLULARER WECHSELWIRKUNG DER PLASTIDEN, ZUGLEICH EIN BEITRAG ZUR METHODIK DER PLASMONANALYSE UND ZUR ENTWICKLUNGSGESCHICHTE VON EPILOBIUM*

Von

P. MICHAELIS

Mit 18 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. Mai 1957)

I. Einleitung und Problemstellung

Wird eine größere Zahl von weiß-grünen Schecken untersucht (CORRENS-WETTSTEIN 1937, WEIER-STOCKING 1952, MICHAELIS 1957a), so lassen sich nach den mikroskopischen Befunden 2 Grundtypen unterscheiden. Bei dem einen Typus kommen zum mindesten während des Höhepunktes der Scheckung zahlreiche „Mischzellen" vor. Diese Mischzellen sind dadurch gekennzeichnet, daß in ihnen 2 scharf geschiedene Plastidenklassen, z. B. ± farblose und grüne Plastiden, in charakteristischen Zahlenverhältnissen auftreten. Alle bisher vom Verfasser untersuchten Schecken mit Mischzellen zeigen einen nicht mendelnden, mütterlichen Erbgang. Auf diesen Typus der Scheckung trifft die allgemein angenommene Theorie einer echten Plastidenvererbung (RENNER 1934) zu: die Unterschiede der Form und des Verhaltens der einzelnen Plastiden werden *endogen* durch die in jedem dieser Plastiden lokalisierten Erbträger (Plastogene[1]) bestimmt. Die Scheckung kommt nach BAUR (1909) durch eine Entmischung der verschiedenen erblich fixierten Plastiden während der Zellteilungen zustande. Es läßt sich nach-

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.
Herrn Professor FITTING zu seinem 80. Geburtstage gewidmet.

[1] Zur Nomenklatur: Plasmon = Summe aller extranucleären Erbträger, Plastom = Summe der in den Plastiden lokalisierten Erbträger (Plastogene IMAIS). Homoplastomatische, resp. heteroplastomatische Zellen enthalten gleichartige, resp. verschiedenartige Plastogene. Plastidom (DANGEARD 1919) = Summe aller Plastiden einer Zelle. Homoplastidische, resp. heteroplastidische Zellen enthalten gleich, resp. verschieden aussehende Plastiden. Mischzellen = heteroplastomatische Zellen. Pseudomischzellen = heteroplastidische, jedoch homoplastomatische Zellen.

weisen, daß das Mischungsverhältnis der normalen und abnormen Plastiden in den Zellen und daß das Vorkommen der Mischzellen und die Anordnung von weißen und grünen Geweben zu Scheckungsmustern wirklich den Verhältnissen entspricht, die sich bei einer Plastidenentmischung im Modellversuch und durch Rechnung ableiten lassen (MICHAELIS 1955a, 1955b, 1957b).

Bei einem zweiten Grundtyp der Schecken fehlen Mischzellen prinzipiell. Dieser Scheckungstyp läßt sich durch die Annahme erklären, daß Aussehen und Verhalten der Plastiden *exogen* durch Wirkstoffe bestimmt werden, die durch die ganze Zelle diffundierend — bei einzelnen Schecken sogar über die Zellgrenzen hinweg diffundierend — sämtliche Plastiden des Plastidoms in gleicher Weise beeinflussen. Über die Herkunft dieser Wirkstoffe läßt sich auf Grund cytologischer Untersuchungen nicht ohne weiteres eine Aussage machen. Bei einem mendelnden Erbgang muß die Scheckung durch chromosomale Gene, z. B. labile Gene, bedingt sein. Bei nicht mendelnder, mütterlicher Vererbung ist eine extrachromosomale Vererbung anzunehmen.

Eine weitere Lokalisation der die Scheckung verursachenden Erbunterschiede in den einzelnen Konstituenten des Zellplasmas ist auf Grund reziproker Kreuzungen (= Unterschiede im Erbbestand der Gameten) oder auf Grund einer nicht mendelnden Vererbung (= extrachromosomale Vererbung) nicht möglich. Es gibt Hinweise, daß sie bei bestimmten Schecken in Plasmakonstituenten lokalisiert sein können, die in sehr großen Zahlen je Zelle vorkommen, wie z. B. Chondriosomen oder Sphaerosomen (MICHAELIS 1955). Andere Scheckungen treten im Verlaufe ausgesprochener Cytoplasma-Entmischungen auf (*irregulare-diversivirescens* MICHAELIS 1954).

In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, daß zwischen den beiden Grundtypen: der Scheckung mit und ohne Mischzellen Übergänge gefunden wurden. Bei der überwiegenden Mehrzahl der untersuchten *albomaculatum*-Schecken mit Mischzellen wurden alle bei einer Plastidenentmischung theoretisch zu fordernden Mischungsverhältnisse gefunden. Bei einigen wenigen Schecken traten kennzeichnende Abweichungen auf: bei Untersuchung junger Blätter mit beginnender Plastidendegeneration waren noch die typischen Mischungsverhältnisse aufzufinden, an alten Blättern aber fehlten Mischzellen, die 1—2 normale Plastiden inmitten degenerierender Plastiden enthielten. Es degenerierten die erblich normalen Plastiden ebenfalls — wenn auch verspätet — wenn sie unter dem Einfluß eines überwiegend „weißen" Plastidoms standen. Es wurden heteroplastomatische Zellen homoplastidisch. Solche Beobachtungen zeigen, daß nicht nur Wechselwirkungen des Plastidoms mit dem Genom, mit dem Cytoplasmon und Wechselbeziehungen der Plastiden mit Erbträgern der extraplastidalen

Plasmakonstituenten in Betracht zu ziehen sind, sondern daß auch Wechselwirkungen zwischen den Einzelplastiden eines Plastidoms vorkommen können. Unter diesen Bedingungen ist es zwar möglich, aus dem Vorkommen von Mischzellen auf eine Plastidenvererbung zu schließen; es ist aber nicht möglich, bei einem Fehlen von Mischzellen eine Plastidenvererbung auszuschließen. In den Fällen einer mütterlich vererbten Scheckung ohne Mischzellen können die Erbunterschiede in den verschiedensten Plasmabestandteilen liegen, und zur genaueren Lokalisation sind weitere Kriterien heranzuziehen.

Eine Lokalisation von Erbunterschieden ist dann möglich, wenn die die Gene enthaltenden Zellbestandteile sich während ihrer Vermehrung und Verteilung von Zelle zu Zelle und von Generation zu Generation verschieden verhalten. Leider ist das Plasmaverhalten während Zellteilung und Befruchtung in seinen Einzelheiten und bei den verschiedenen Objekten zu wenig untersucht, als daß sich zur Zeit brauchbare Anknüpfungspunkte für die Plasmonanalyse ergeben würden. Dagegen ist bekannt, daß die einzelnen Plasmakonstituenten wie Plastiden, Chondriosomen, Sphaerosomen, Cytoplasma-Makromoleküle usw. in sehr verschiedenen Zahlen je Zelle vorkommen und daß — ebenso wie die Zahlen der Mendelspaltung vom Polyploidiegrad abhängig sind — die Entmischungsgeschwindigkeit der plasmatischen Erbträger von ihrer Zahl je Zelle bestimmt wird. Es müssen sich also aus der Entmischungsgeschwindigkeit Rückschlüsse darüber ziehen lassen, ob ein Erbunterschied in den Plastiden, Chondriosomen, Sphaerosomen oder im lichtoptisch homogen erscheinenden Cytoplasma zu lokalisieren ist (MICHAELIS 1955a, 1955b).

Die Entmischungsgeschwindigkeit plasmatischer Erbträger braucht nicht im Kreuzungsversuch bestimmt zu werden, sondern kann schon intraindividuell durch Analyse der Entmischungsmuster festgestellt werden. Es sind dazu folgende Voraussetzungen nötig:

1. Rückschlüsse von der Entmischungsgeschwindigkeit auf die Zahl der sich entmischenden Erbträger können nur dann gezogen werden, wenn die Erbträger zufallsgemäß bei den Zellteilungen verteilt werden. Cytologische Beobachtungen über die Verteilung der Erbträger lassen sich höchstens an den Plastiden durchführen, fehlen aber auch hier noch. Es ist jedoch möglich, aus der Anordnung der Scheckungsmuster das Verhalten der Erbträger indirekt zu erschließen (MICHAELIS 1957b). Abweichungen von der zufallsgemäßen Verteilung lassen sich rechnerisch berücksichtigen, sofern das Ausmaß der Abweichungen bekannt ist.

2. Es muß die Zahl der in Betracht zu ziehenden Plasmakonstituenten während der maßgeblichen Zellteilungen wenigstens der Größenordnung nach bekannt sein. Dann können von bestimmten Zahlen ausgehend durch mathematische Berechnungen (MICHAELIS 1955b) oder im Modellversuch (MICHAELIS 1955a) die Gesetzmäßigkeiten der zufalls-

gemäßen Entmischung abgeleitet und mit den Befunden der Musteranalyse verglichen werden. Brauchbare Bestimmungen über die Zahlen der Plastiden je Zelle liegen bisher in der Literatur nicht vor, bei *Epilobium* wurden nur vorläufige Zählungen durchgeführt. Über die Zahl von Chondriosomen und Sphaerosomen existieren nur grobe Schätzungen. Diese Zahlen genügen jedoch vorerst, um den Gang der Untersuchungsmethode zu zeigen und um Bestimmungen wenigstens der Größenordnung nach durchzuführen.

3. Es muß das Mischungsverhältnis normaler und abgeänderter Zellkonstituenten, bei exogen bedingter Scheckung das Verhältnis normaler und abgeänderter Zellen in einer möglichst großen Zellpopulation vor und nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungsfolgen bestimmt werden. Für diese Bestimmung ist bei Kormophyten und Metazoen eine genaue Kenntnis der Entwicklungsgeschichte nötig. Man muß wissen, wie ein bestimmtes Entmischungsmuster entstanden ist, wieviel Zellteilungsfolgen zu seiner Entstehung führten und in welcher Weise die einzelnen Zelldeszendenzlinien angeordnet und miteinander verknüpft sind. Leider genügt die bisherige Kenntnis der Entwicklungsgeschichte zur Durchführung der Bestimmungen in keiner Weise, um so weniger, als sich die einzelnen Geno- und Plasmotypen sehr verschieden verhalten können. Bei der Aufklärung der Entwicklungsgeschichte vermag aber die Analyse der Entmischungsmuster selbst wieder wertvolle Hilfe zu leisten.

4. Schließlich ist es noch notwendig, die Wechselbeziehungen der Erbfaktoren untereinander zu berücksichtigen. Ebenso wie die nach der Mendelspaltung beobachtbaren Zahlenverhältnisse von den Dominanzverhältnissen der Kerngene abhängig sind, so wird durch die Wechselwirkung der Plasmagene das Auftreten homoplastidischer Zellen beeinflußt. Die Art dieser Wechselbeziehungen kann ebenfalls durch Analyse der Entmischungsmuster erschlossen werden.

Die Klärung dieser verschiedenen Voraussetzungen ist bei *Epilobium* begonnen worden, doch wird es noch langer Untersuchungen bedürfen, um ein wirklich allseits tragfähiges Fundament zur Durchführung einer exakten Plasmonanalyse zu erhalten. Der Verfasser ist sich über einzelne zur Zeit noch bestehende Unzulänglichkeiten durchaus klar. Trotzdem erscheint es bei der großen Wichtigkeit einer Plasmonanalyse wünschenswert, schon jetzt an einem besonders günstig gelagerten Fall die neue Methode zu erproben und eine Bestimmung wenigstens der Größenordnung nach durchzuführen, um den Untersuchungsgang und seine Erfordernisse kennenzulernen und zur Diskussion zu stellen. Es ist damit zu rechnen, daß bei anderen Objekten, die einfachere entwicklungsgeschichtliche Verhältnisse zeigen, die Methode schneller und sicherer zum Ziele führt.

II. Die Stammpflanze 1956.1323.82

Unter der Aussaat 1956.1323, die zur Feststellung des Erbganges einer *albomaculatum*-Pflanze dienen sollte, trat die Schecke 1956.1323.82

auf. Ihre Scheckung unterschied sich deutlich vom Scheckungstyp der Mutter, so daß sie als spontane Neumutation angesehen werden muß, wie sie in allen *Epilobium* Aussaaten in geringer Häufigkeit vorkommt. An dieser Pflanze 1956.1323. 82 trat eine hier näher interessierende zweite Scheckung infolge nochmaliger Mutation auf. Um diese zweite Mutation identifizieren zu können, ist eine Beschreibung der ersten Scheckung notwendig.

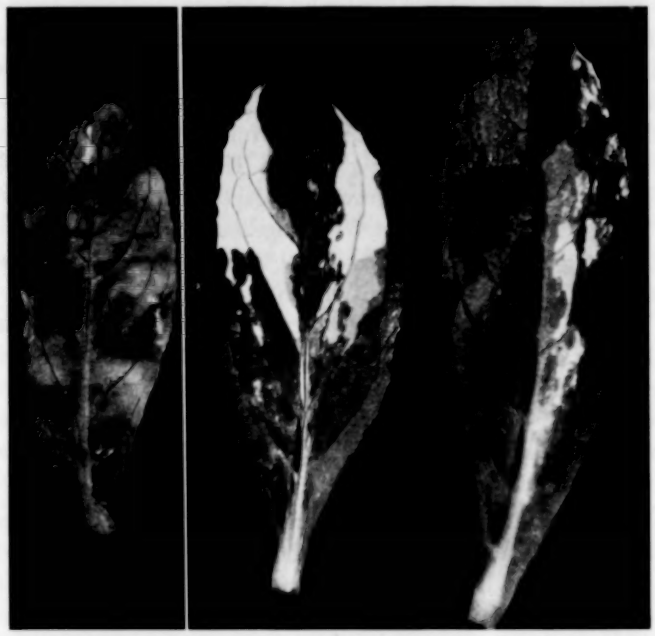


Abb. 1. Gescheckte Blätter der Pflanze 1956. 1323.82. Von links nach rechts: Blatt des 6. Wirtels mit beginnender Entmischung, Blätter des 7. und 8. Wirtels mit starken Entmischungen

An der Pflanze 1956.1323.82 wurde bald nach der Keimung eine elfenbeinweiße Fleckung beobachtet. Sie zeigte in den einzelnen Blattarealen eine sehr verschiedene Fleckendichte und Fleckengröße. Es entstand ein stark ineinander verschachteltes Blattmuster, wie es für eine plasmonisch bedingte Scheckung charakteristisch ist (MICHAELIS 1957a). Die ersten, relativ kleinen und getrennt liegenden Flecken wurden im 4. Blattwirtel über den Keimblättern gefunden. Die Fleckendichte nahm an den folgenden Blättern rasch zu. Vom 7. Blattwirtel an zeigte die eine Hälfte der Pflanze eine dichte Scheckung, die mit dem 9. Wirtel auf die ganze Pflanze übergriff. Die Flecken waren zufallsgemäß über die Blattfläche verteilt, so daß eine zufallsgemäße Verteilung der Plastiden während der Zellteilungen angenommen werden

muß. Am 8. Blattwirtel trat die erste völlig entmischte, rein weiße Blatthälfte auf. Vom 15. Blattwirtel an war 1 Quadrant der Pflanze periklinal gescheckt, wobei eine rein weiße hypodermale Schicht über einem grünen Korpus lag. In anderen Sektoren blieb die fein verschachtelte Fleckung bis in die Blütenregion erhalten. Von den Seiten-

Abb. 2. Periklinal gescheckte Blatt und Seitensproß der Pflanze 1956. 1323. 82. Links: Zur Hälfte periklinal gescheckte Blatt des 17. Blattwirtels. Die Parenchyme dieser Laminahälfte werden zum größten Teil aus den rein weißen Zellabkömmlingen der hypodermalen Schicht aufgebaut. Nur an einigen Stellen ragen Zellen des grünen Korpus von der Blattrippe in die Fläche der Lamina hinein und schimmern hellgrün durch das überlagernde weiße Gewebe hindurch. Rechts: Im oberen Teil periklinal gescheckter Seitenast des 14. Blattwirtels. Die periklinale Gewebeanordnung ist daran zu erkennen, daß vielfach der Mittelrippe ein schmaler, blaßgrüner Gewebestreifen anliegt. An den obersten knospentragenden Sproßteilen beteiligt sich der grüne Korpus nicht mehr am Aufbau der Blattlamina. Die Blätter erscheinen rein weiß

sprossen hatten mehrere, darunter der hier noch weiter interessierende hintere Seitensproß des 13. Blattwirtels rein weiße Quadranten. Andere wurden zu Periklinalchimären, bei denen ebenfalls rein weiß über grün lag (Abb. 1—2).

Eine Untersuchung der Entmischungsmuster bei schwächeren Vergrößerungen ergab folgendes Bild: An allen Grenzen, an denen, entwicklungsgeschichtlich bedingt, grüne Zelldeszendenzen neben weißen zu liegen kommen, sind die Grenzen völlig scharf. Es findet also keine Wechselwirkung zwischen weißen und grünen Zellen statt. Innerhalb

der Entmischungszonen liegen inmitten grüner Areale isolierte, weiße Zellgruppen (Abb. 3), ebenso aber auch umgekehrt kleine grüne Zellgruppen inmitten weißer Flächen. Es ist das ein Zeichen, daß es ± grün, resp. ± weiß erscheinende Zellen gab, die noch heteroplasmonisch waren und im Verlauf weiterer Zellteilungen Zellen der entgegengesetzten Färbung abgaben. Heteroplastidische Zellen findet man an den Orten mit Entmischungen, die bis in die letzten Zellteilungsfolgen

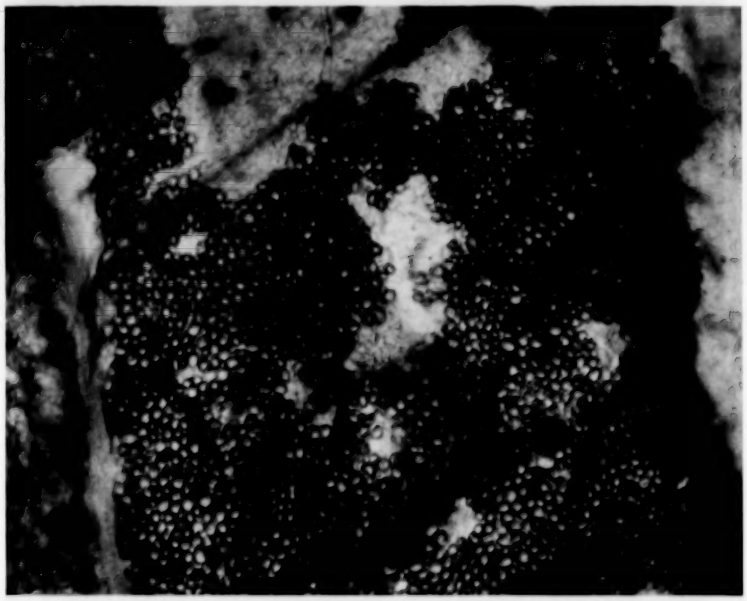


Abb. 3. Entmischungsmuster im Palisadenparenchym der Schecke 1956.1323.82 mit grünen und farblosen Zellgruppen. An den Grenzen vielfach blaßgrüne Mischzellen. Flächenansicht eines mit Zuckerlösung infiltrierten unbeschädigten Blattstückes

reichen, besonders in der Nachbarschaft kleinster isoliert liegender Flecken. Dort können Übergangszellen mit verschiedener Intensität der Grünfärbung beobachtet werden. Solche Übergangszellen erwiesen sich bei Betrachtung mit starken Vergrößerungen als „Mischzellen". Sie enthielten neben völlig normalen Plastiden kleine, farblose, schaumig verquellende Plastiden, wie sie für das rein weiße Gewebe kennzeichnend sind (Abb. 4 links). Eine Prüfung der Mischungsverhältnisse zeigte, daß sehr verschiedene Mischungszahlen vorkamen. In der Nachbarschaft grüner Zellen überwogen durchschnittlich die grünen Plastiden, in der Nähe der weißen Zellen wurden meistens die grünen Plastiden seltener. Doch können in benachbarten Zellen sehr verschiedene Verhältniszahlen beobachtet werden. Zellen, die aber aus Teilung einer Mutterzelle hervorgingen, besaßen ähnliche Mischungs-

verhältnisse. Im großen und ganzen stimmen die Mischungsverhältnisse mit den Entmischungszahlen überein, die in Modellversuchen bei einer zufallsgemäßen Entmischung von 2 Konstituentenklassen erhalten wurden.

Unter diesen Umständen ist die Scheckung der Pflanze 1956.1323.82 folgendermaßen zu deuten: die vielfach verschachtelte Musterung belegt

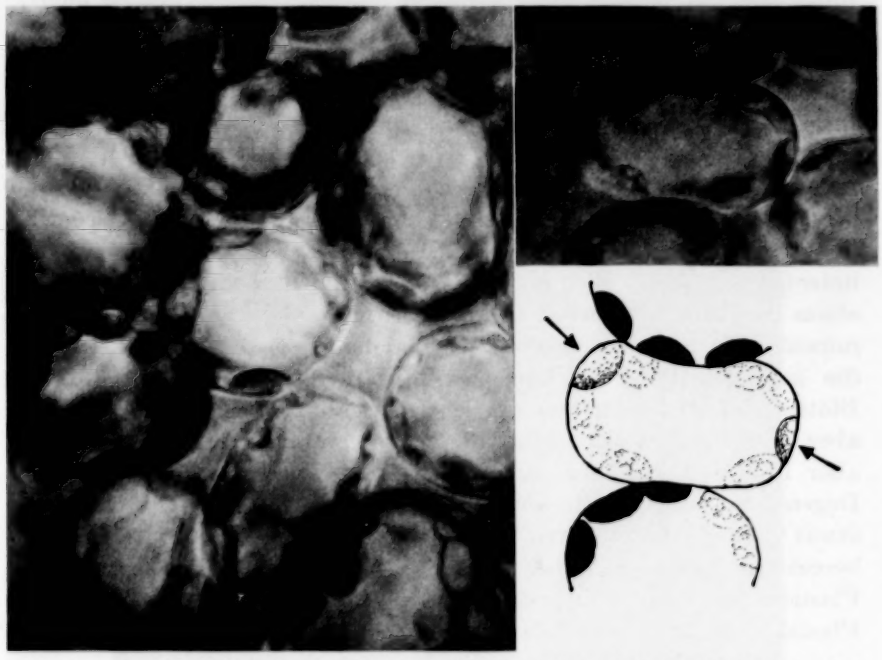


Abb. 4. Links: Mischzellen der Pflanze 1956.1323.82, die neben den großen normalen Plastiden kleinere farblose, schließlich schaumig verquellende Plastiden enthalten. Rechts: Mischzelle, die neben einer Mehrzahl degenerierender Plastiden zwei genetisch normale Plastiden enthält, die aber unter dem Einfluß der vielen mutierten Plastiden ebenfalls degenerieren (←). Unten Zeichnung nach dem lebenden Präparat, oben Photographie, in der nur das rechte „normale" Plastid in der optischen Ebene liegt. Es besitzt eine dunklere, schwach grün gefärbte Kappe. Photographien der noch von der Epidermis überlagerten Palisadenparenchymzellen

einen aus vielen Teilschritten zusammengesetzten Abänderungsvorgang (Michaelis 1957a), der von einem bestimmten Zeitpunkt der Ontogenese beginnend sich zu einem Höhepunkt steigert, um dann wieder abzuklingen. Solch ein intraindividuell ablaufender Abänderungsvorgang ist für eine extrachromosomale Vererbung charakteristisch, bei der sich im Verlauf der Zellteilungen die plasmatischen Erbkonstituenten durch zufallsgemäße Umkombination entmischen. Die Untersuchung der Scheckungsmuster und die Auffindung heteroplastidischer Zellen in kennzeichnenden Zahlenverhältnissen sprechen für eine echte endogen wirkende Plastidenvererbung.

Nun zeigte aber ein genauer Vergleich der in den heteroplastidischen Zellen aufzufindenden Zahlenverhältnisse eine Differenz zu den bei einer Plastidenvererbung theoretisch zu fordernden Zahlenverhältnissen. Es gelang anfangs nicht, heteroplastidische Zellen aufzufinden, die 1 oder 2 normalgrüne Plastiden in einer „weißen" Umgebung enthielten. Solche Zellen sind aber theoretisch unbedingt zu fordern und müßten in der Nähe weißer Zellinseln aufzufinden sein, um so mehr, als sie mikroskopisch verhältnismäßig leicht zu erkennen wären. Die Untersuchung verschieden alter Blätter deckte, wie in einigen anderen Fällen, die Ursachen dieser Differenz auf. In sehr jungen Blättern sind „weiße" und „grüne" Plastiden noch nicht zu unterscheiden. Beide Plastidenklassen sind in diesem Entwicklungsstadium noch grün. Erst im Laufe der Blattalterung verlieren die mutierten Plastiden ihr Chlorophyll und degenerieren. Bei beginnender Degeneration ließen sich noch alle theoretisch zu fordernden Mischungsverhältnisse feststellen. In heteroplastidischen Zellen mit nur 1—3 normalen Plastiden waren diese etwas verkleinert, während in Mischzellen mit einer größeren Anzahl normaler Plastiden alle grünen Plastiden die gleiche Größe besitzen wie die normalen Plastiden homoplastidisch grüner Zellen. In älteren Blättern fehlen Mischzellen mit 1—3 normalen Plastiden. Es wurden aber gelegentlich Zellen gefunden, die rein weiß erschienen, in denen aber 1 oder 2 Plastiden zwar eindeutige Zeichen einer schaumigen Degeneration zeigten, die aber doch, meistens einseitig gelagert, noch etwas Chlorophyll enthielten (Abb. 4 rechts). Es ist wohl die Annahme berechtigt, daß es sich bei diesen Plastiden um genetisch normale Plastiden handelt, die unter dem Einfluß der zahlreichen übrigen weißen Plastiden der Zelle ebenfalls degenerieren.

III. Die neu aufgetretene Mutation

An der Pflanze 1956.1323.82 trat in dem rein weißen Sektor des hinteren Achselsprosses des 13. Blattwirtels eine neuartige Scheckung (Abb. 5) auf, die auf Grund der Musteranalyse und des mikroskopischen Untersuchungsbefundes als Neumutation angesprochen werden muß.

1. Zur Entwicklungsgeschichte des Epilobium-Sprosses

Zur Beurteilung der Musterung ist es nötig, kurz die Entwicklungsgeschichte des *Epilobium*-Sprosses zu schildern. Während der Embryoentwicklung (Bartels 1956) werden durch die 2. und 3. Teilung der Eizelle 4 Quadranten gebildet, von denen mit der 6. Teilungsfolge die 4 Initialzellen des Sproßvegetationspunktes abgeschnitten werden. Durch die Tätigkeit dieser 4 Initialen entstehen 4 Sproßsektoren, die sich bis in die Blütenregion verfolgen lassen, wenn eine der Initialen und ihre

Zellabkömmlinge durch Genmutation oder Plasmonabänderung markiert werden. Auch in den Seitensprossen lassen sich 4 solcher Quadranten feststellen, deren jeder eine selbständige, von den Nachbarquadranten unabhängige Zelldeszendenz enthält. Die gegenständig stehenden *Epilobium*-Blätter der einzelnen Blattwirtel sind so inseriert, daß die Blatt-

Abb. 5. Neuartige Scheckung auf einem Blatt des 5. Blattwirtels des Seitensprosses 13 hinten der Pflanze 1956. 1323. 82. Links Blattunterseite, rechts Blattoberseite

hälften eines Blattes aus 2 benachbarten Sproßquadranten entstehen, jedes Blatt also aus Zellabkömmlingen von 2 von einander weitgehend unabhängigen Zelldeszendenzlinien zusammengesetzt ist (Abb. 6).

2. *Die neue Scheckung*

Vom Achselsproß 13 hinten der Pflanze 1956. 1323. 82 interessiert hier der linke[1] adaxiale Sproßquadrant. Im 1. Blattwirtel wurde noch ein gescheckes Blatt gebildet. Die weiteren, diesem Quadranten

[1] Vom Sproß her gesehen.

angehörigen Blatthälften waren aber vom 2. Blattwirtel an rein weiß. Die die Blatthälften abgebende Sproßinitialzelle muß also zwischen dem 1. und 2. Blattwirtel homoplastidisch „weiß" geworden sein, denn es ist nach den Berechnungen und Modellversuchen theoretisch nicht vorstellbar, daß eine Heteroplastomatie über die zahlreichen, zum Aufbau mehrerer Sproßwirtel und ihrer Blätter notwendigen Zellteilungsfolgen erhalten blieb, ohne daß durch eine Entmischung grüne Zellen entstehen. Erst in der Blatthälfte des 5. Wirtels entstand auf einem eng umgrenzten Areal der Blattunterseite eine neue grüne Scheckung.

Abb. 6. Diagrammatische Zeichnung des Achselsprosses 13 hinten der Pflanze 1956. 1323. 82. Die Hauptachse würde am oberen, das Tragblatt des Achselsprosses am unteren Bildrande liegen. Weißes Gewebe ist weiß, grünes Gewebe schwarz, gescheckte Blattteile sind punktiert gezeichnet. Der Ort der neu aufgetretenen Scheckung ist durch Kreuze angegeben

Schon die Art des Auftretens der neuen Scheckung in einem rein weißen Quadranten ließ auf eine Neumutation von „weiß" zu „grün" schließen. Die mikroskopische Untersuchung bestätigte diesen Schluß, denn sie zeigte an der grünen Scheckung einen Scheckungstyp, der sich von dem der Stammpflanze 1956. 1323. 82 deutlich unterschied. Inmitten des weißen Gewebes entstanden mehrere voneinander isolierte grüne Flecken. Innerhalb der grünen Areale einer ± einheitlichen Zelldeszendenz fehlten aber — im Gegensatz zur Stammpflanze — isolierte weiße Zellen und Zellgruppen. Bei der Besprechung der Wirkungsweise der mutierten Erbträger wird auf diese Feststellung nochmals zurückzukommen sein. Weiße Zellinseln in einer ± grünen Umgebung wurden nur selten dort gefunden, wo 2 in verschiedener Geschwindigkeit entmischende Zelldeszendenzlinien aneinander grenzten und weiß zufällig neben grün zu liegen kam.

Die grünen Areale kommen ausschließlich auf einer eng umschriebenen Fläche der Blattunterseite vor (Abb. 5). Wie Querschnitte durch die verschiedenen grünen Flächen zeigen, liegen die grünen Zellen alle in einer einzigen Zellschicht, der hypodermalen Schicht. Die mutierten Zellen haben nicht die Form typischer Schwammparenchymzellen, sondern gleichen großen langgestreckten Palisadenzellen (Abb. 7). Es wird an anderer Stelle zu schildern sein, daß die Unterschiede zwischen der Form der Schwamm- und Palisadenzellen wesentlich durch den

Teilungsrhythmus der Zellen und durch die dadurch bedingten Spannungsverhältnisse im Blatt bestimmt werden. Isoliert im weißen *albomaculatum*-Gewebe der Blattunterseite liegende grüne Schwammparenchymzellen nehmen bei be-

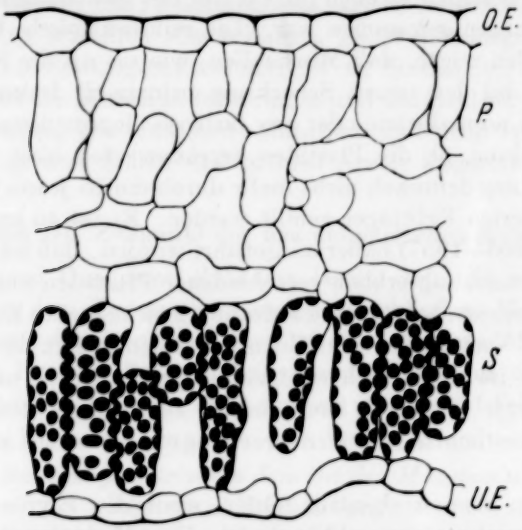


Abb. 7. Oben: Querschnitt durch das gescheckte Blatt. Die farblose Palisadenschicht der Blattoberseite ist wenig ausgeprägt und besonders reich an Intercellularen. Die zu grün abgeänderten Zellen der Blattunterseite nehmen die Form von besonders großen Palisadenzellen an. Unten: Palisadenähnliche Zellen der Blattunterseite im optischen Querschnitt, durch die untere Epidermis hindurchgesehen

stimmten *albomaculatum*-Typen regelmäßig die Form von Palisadenzellen an, während umgekehrt weiße Einzelzellen inmitten von grünen Palisadenzellen zu sternartiger oder schlauchartiger Form ausgezogen werden können.

Die Grenzen zwischen grünem und weißem Gewebe waren an allen Stellen völlig scharf. Übergangszonen fehlten auch am Rande kleinster Flecken, also dort, wo es noch im Verlauf der letzten Zellteilungsfolgen zu Entmischungen gekommen war. Die mikroskopische Untersuchung der Einzelzellen zeigte, daß Mischzellen, wie sie an der Stammpflanze häufig sind, bei der neuen Scheckung prinzipiell fehlen. Die Zellen enthalten nur normalgrüne oder nur farblose, degenerierende Plastiden. Die Entscheidung, ob die Plastiden ergrünen oder nicht, kann an der neuen Scheckung demnach nicht mehr durch die in jedem der Plastiden selbst lokalisierten Erbträger gefällt werden. Es ist an anderen Stellen (Michaelis 1955—1957) näher ausgeführt worden, daß bei einer zufallsgemäßen Entmischung erblich verschiedener Plastiden stets Mischzellen vorkommen müssen, solange es überhaupt noch zu neuen Entmischungen kommt. Das Vorkommen von Entmischungen bis in die letzten Zellteilungsfolgen ist aber durch wenigzellige grüne Areale mit nur 12 bis 16 Zellen belegt. Demnach kann für die neu aufgetretene Scheckung eine endogen bestimmte Plastidenvererbung mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Mischzellen können ebenfalls fehlen, wenn die Ergrünungsfähigkeit von chromosomalen Genen abhängig ist. Eine Mutation chromosomaler Gene läßt sich hier zwar nicht mit absoluter Sicherheit ausschließen, ist aber sehr wenig wahrscheinlich. Eine Prüfung im Erbversuch ließ sich nicht durchführen, da die Scheckung auf somatisches Gewebe beschränkt blieb und nicht auf den Achselsproß des Blattes übergriff. So waren nur Rückschlüsse aus der Art der Musterbildung möglich, die darunter leiden, daß das Muster nicht sehr umfangreich ist. Da die Scheckung aus vielen Flecken getrennter Entstehung besteht, so scheidet zu Deutung eine einfache Genmutation aus. Bei einer einfachen Genmutation müßte vom Zeitpunkt der Mutation an eine einheitlich grüne Zelldeszendenz, in einem Blatt also ein einziges grünes Areal entstehen. Das vorliegende Muster ließe sich höchstens durch die Entstehung eines labilen Alleles erklären, das relativ häufig von weiß zu grün mutiert. Jeder der grünen Flecke müßte auf eine Mutation des labilen Alleles zurückgeführt werden. Es wird später (VI, S. 86ff.) noch zu schildern sein, daß sich aus der Zellzahl der grünen Flecken der Zeitpunkt der einzelnen Abänderungsschritte berechnen läßt. Auf solche Weise erhält man eine Kurve der Abänderungshäufigkeit, die, wie Abb. 18 zeigt, keine einigermaßen konstante Werte gibt, sondern einen raschen Anstieg der Abänderungshäufigkeit zu einem Maximum und dann wieder eine Abnahme zeigt. Ein solches Verhalten ist bei Plasmonentmischungen zu erwarten, bei der Annahme eines labilen Genes aber wenig wahrscheinlich. Leider läßt sich wegen der geringen Ausdehnung des Musters die für eine plasmatische Entmischung charakteristische Verschachtelung des Musters nicht mit Sicherheit feststellen.

Unter diesen Umständen mag der Versuch gerechtfertigt erscheinen, von der Annahme einer Plasmon-Entmischung ausgehend, das Muster weiter zu analysieren, um zu untersuchen, welche Zellkonstituenten von der Entmischung betroffen sein könnten. Es ist dies möglich, wenn es gelingt, die Entmischungsgeschwindigkeit zu bestimmen. Es ist notwendig, den Ort der Mutation festzulegen und die Zahl der Zellteilungsfolgen festzustellen, die zwischen Mutation und dem Auftreten der verschiedenen grünen Zellen und grünen Areale abgelaufen sind.

IV. Über den Zeitpunkt der neu aufgetretenen Mutation

Zeitpunkt und Ort einer Mutation lassen sich mit relativ großer Genauigkeit aus dem Entmischungsmuster erschließen. Man muß hierbei jedoch berücksichtigen, daß der Ort einer Plasmon-Mutation, der Ort der ersten Plasmon-Entmischungen und der Ort, an dem die Entmischungen sichtbar werden, nicht immer zusammenfallen.

1. Über die Beziehungen zwischen dem Ort der Mutation und dem Ort der ersten Entmischung

Um diese Beziehungen näher ableiten zu können, seien die Verhältnisse an Hand der hier besonders interessierenden Plastidenentmischung besprochen. Soll ein Plasmakonstituent als Erbträger fungieren können, so muß zwischen Zellvermehrung und Vermehrung des Erbträgers in dem Sinne eine Koordinierung bestehen, daß zwischen den Zellteilungen auch regelmäßig Teilungen des Erbträgers erfolgen. Für die Plastiden der *Epilobium*-Blätter läßt sich diese Koordinierung sowohl indirekt aus den Plastidenzahlen je Zelle, teils direkt durch Beobachtung der Plastidenteilung belegen. Über diese Beobachtungen sei ausführlich an anderer Stelle (Michaelis 1957b) berichtet. Hier sollen die Verhältnisse nur so weit geschildert werden, daß die Berechtigung der Ableitungen erkennbar wird.

Zählt man im ausdifferenzierten *Epilobium*-Blatt in den einzelnen Geweben die Plastiden je Zelle, so erhält man für jeden Gewebetypus einen kennzeichnenden, eng umschriebenen Zahlenbereich. Eine solche Zahlenkonstanz ist nur zu verstehen, wenn a) zwischen 2 Zellteilungen auch wieder eine Plastidenteilung eingeschoben wird, in der sich alle oder doch die Mehrzahl der Plastiden teilen, und dadurch die ursprüngliche Plastidenzahl wieder hergestellt wird. In den jungen Blättern findet man in Zellen, die aus einer Mutterzelle durch Teilung hervorgegangen sind, die Mehrzahl der Plastiden in ähnlichen Teilungsstadien. Die Plastidenteilung erfolgt, wenn auch nicht völlig, so doch nahezu synchron. b) Weiterhin müssen die Plastiden während jeder Zellteilung ungefähr gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt werden.

Um nun die Gesetzmäßigkeiten der Plastidenentmischung ableiten zu können, wurde folgendes, etwas vereinfachendes Modell verwendet: die kennzeichnende Zahl der Plastiden je Zelle sei kurz nach der Zellteilung n, nach der Plastidenteilung $2n$. Diese Zahl wird mit der nächsten Zellteilung wieder auf n reduziert, indem jede Tochterzelle n Plastiden erhält. Auf dieser Basis läßt sich die Wahrscheinlichkeit der Entmischungsgeschwindigkeit z. B. nach Mutation berechnen. Auf Komplikationen dieses Modelles wird später noch einzugehen sein.

Tritt eine Plastidenmutation nach der Teilung der Erbträger und vor der folgenden Zellteilung ein, so liegt unter $2n$ Erbträgern ein mutierter Erbträger, der während der nächsten Zellteilung in eine der Tochterzellen gelangt und dort mit der Teilung der Erbträger verdoppelt wird. Erst in der nächsten Zellteilung kann dann eine Entmischung beginnen. In diesem Falle besteht also zwischen Mutation und Entmischung auf alle Fälle eine Diskordanz von 1 Zellteilungsfolge. Erfolgt die Mutation des Erbträgers vor der Teilung der Erbträger, so liegen nach deren Teilung und vor der Zellteilung unter $2n$ Erbträgern zwei mutierte Erbträger, die nun entweder zusammen in eine der beiden Tochterzellen gelangen oder auf beide Tochterzellen verteilt werden. Die Wahrscheinlichkeit, daß in dieser Zellteilung der erste Entmischungsschritt erfolgt, ist bei einer zufallsgemäßen Verteilung ungefähr 50%, die Wahrscheinlichkeit, daß eine Tochterzelle alle beiden mutierten Plastiden erhält, ist für jede der Tochterzellen rund 25%. Mit jeder folgenden Zellteilung werden die mutierten Erbträger auf 4, weiterhin auf 8 usw. verdoppelt. Die Wahrscheinlichkeit, daß auch in diesen Zellteilungen alle 4, 8 usw. mutierten Erbträger wieder in 1 Zelle gelangen, sinkt bei zufallsgemäßer Verteilung rasch. In Tabelle 1 ist die theoretisch zu erwartende Häufigkeit, die mit der Zahl der Erbträger je Zelle etwas variiert, angegeben.

Tabelle 1. *Wahrscheinlichkeit in %, daß nach Mutation bei zufälliger Verteilung der Erbträger keine Entmischung erfolgt, sondern alle mutierten Erbträger gemeinsam in eine Zelle gelangen*

Zahl der Zellteilungsfolgen	Zahl der mutierten Erbträger	$n = 5$ %	$n = 10$ %	$n = 25$ %
1	2	22,22	23,68	24,49
2	4	0,53	1,03	1,34
3	8	0,24	0,0004	0,0027
4	16	0,90	0,0001	0,000000001

Nach diesen Zahlen kann der auf Grund des Entmischungsmusters bestimmte Ort der ersten Entmischung um einige wenige Zellteilungsfolgen später liegen als der eigentliche Ort der Mutation. Doch wird die Differenz kaum mehr als 3 Zellteilungsfolgen betragen können.

2. *Der Ort der ersten Entmischung*

Der Ort der ersten Entmischung muß an der Vereinigungsstelle aller Zelldeszendenzlinien liegen, in denen im Laufe der Zellvermehrung abgeänderte Zellen auftreten. Um diesen Ort angeben zu können, muß jedoch die Gewähr gegeben sein, daß alle heteroplasmonischen Zelldeszendenzen sich so lange vermehren können, bis es zu einer sichtbaren Entmischung kommt. Der Zeitpunkt, zu dem eine Entmischung sichtbar wird, hängt von der Wirkungsweise der mutierten Erbträger und von ihrer Menge je Zelle ab. Genügt schon 1 Erbträger je Zelle für eine Manifestation, so wird die Mutation sofort sichtbar. Das gegensätzliche Extrem dazu ist, wenn sich die Mutation nur homoplasmonisch manifestiert. In diesem Falle wird der Entmischungsvorgang erst relativ spät sichtbar. Mit Hilfe der durchgeführten Berechnungen läßt sich ziemlich genau feststellen, wieviel Zellteilungsfolgen bis zum Auftreten homoplasmonisch mutierter Zellen nötig sind. Diese Zahl der Zellteilungsfolgen ist in hohem Maße von der Zahl der Erbträger je Zelle abhängig. In Tabelle 2 ist die Entmischungswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der hier in Betracht zu ziehenden Zahl der Erbträger je Zelle und von der Zahl der Zellteilungsfolgen nach Mutation angegeben.

Tabelle 2. *Prozentuale Wahrscheinlichkeit für das Auftreten homoplasmonisch mutierter Zellen nach Mutation bei zufallsgemäßer Verteilung der Erbträger während der Zellteilungen*

Zahl der Zellteilungsfolgen	Zahl der Erbträger je Zelle		
	$n = 5$	$n = 10$	$n = 25$
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0,244	0	0
4	0,903	0,0001	0
5	1,915	0,002	$\cong 0$
6	3,151	0,012	$\cong 0$
7	4,495	0,039	$\cong 0$
8	5,861	0,088	$1{,}4 \times 10^{-8}$
9	7,192	0,170	$2{,}5 \times 10^{-7}$
10	8,455	0,286	$2{,}0 \times 10^{-6}$
11	9,631	0,435	0,00001
12	10,711	0,618	0,00002
13	11,695	0,829	0,0001
14	12,586	1,066	0,0002
15	13,389	1,323	0,0005
16	14,108	1,596	0,001
17	14,754	1,880	0,002
18	15,330	2,172	0,003
19	15,846	2,470	0,005
20	16,304	2,778	0,007
21	16,712	3,066	0,011
22	17,076	3,360	0,016
23	17,400	3,650	0,021
24	17,688	3,934	0,029
25	17,945	4,210	0,037
26	18,173	4,479	0,047
27	18,375	4,739	0,059
28	18,556	4,989	0,072
29	18,716	5,232	0,088
30	18,858	5,464	0,104
31	18,985	5,688	0,123
32	19,100	5,902	0,144
33	19,200	6,107	0,166
34	19,287	6,303	0,191
35	19,365	6,489	0,216
∞	20,000	10,000	4,000

Diese Entmischungswerte sind bei höheren Konstituentenzahlen relativ klein, doch sind diese Werte auf die Zahl der gebildeten Zellen zu beziehen, die mit der Zahl der Zellteilungsfolgen sehr rasch zunimmt (Tabelle 3).

Tabelle 3. *Zahl der Zellen in Abhängigkeit von der Zellteilungsfolge*

Zahl der Zellteilungsfolgen	0 %	10 %	25 %	50 %
	der Zellen bleiben in einer Zellteilungswelle ungeteilt liegen			
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
1	2	1,9	1,8	1,5
2	4	3,6	3,1	2,3
3	8	6,9	5,4	3,4
4	16	13,0	9,4	5,1
5	32	24,8	16,4	7,6
6	64	47,0	28,7	11,4
7	128	89,4	50,3	17,1
8	256	169,8	88,0	25,6
9	512	322,7	153,9	38,4
10	1024	613,1	269,4	57,7
11	2048	1164	471	86
12	4096	2213	825	130
13	8192	4205	1443	195
14	16384	7990	2527	292
15	32768	15181	4422	438
16	65536	28844	7738	657
17	131072	54804	13541	985
18	262144	104127	23697	1478
19	524248	197842	41469	2217
20	1048576	375900	72570	3325
21	2097152	714209	126997	4988
22	4194304	1356998	222246	7482
23	8338608	2578296	388930	11223
24	16777216	4898762	680628	16834
25	33554432	9307649	1191099	25251
26	67108864	17684533	2084424	37876
27	134217728	33600613	3647742	56815
28	268435456	63841165	6383548	85222
29	536870912	121298213	11171209	127834
30	1073741824	230466605	19549616	191751

Bei den sehr einfach gestalteten *Epilobium*-Blättern liegen keinerlei Hinweise vor, daß einzelne hier in Frage kommende Zelldeszendenzlinien ungeteilt liegenbleiben. Im *Epilobium*-Blatt laufen mindestens 20 Zellteilungsfolgen ab, und die bei der Mutation der Pflanze 1956. 1323.82 in Betracht zu ziehenden Zellareale enthalten nach den später noch zu erwähnenden Zellzählungen mindestens 50000 Zellen. Wenn eine Entmischung in frühen Stadien der Blattentwicklung beginnt, so darf man annehmen, daß alle primären heteroplasmonischen Zelldeszendenzlinien Gelegenheit zu einzelnen, sichtbaren Entmischungen hätten finden müssen. Man kann also den Vereinigungspunkt aller Zelldeszendenzlinien, in denen grüne Zellen beobachtet wurden, als den Punkt ansehen, an dem die erste heteroplasmonische Zelle des Blattes entstand. Der Ort der eigentlichen Mutation kann mit diesem Punkt

zusammenfallen, kann aber auch, wie oben besprochen, einige wenige Zellteilungsfolgen davor gesucht werden. Selbstverständlich gelten die hier dargestellten Überlegungen nur, wenn die Erbträger während der Zellteilungen zufallsgemäß verteilt werden. Eine solche zufallsgemäße Verteilung läßt sich aber durch eine zufallsgemäße Anordnung der Einzelflecken im Muster belegen.

3. Zur Entwicklungsgeschichte des Epilobium-Blattes

Bevor nun versucht werden soll, den Ort der an Pflanze 1956.1323.82 erfolgten Mutation zu bestimmen, sollen an Hand der Scheckungsmuster der Pflanze die hier interessierenden Abschnitte der Blattentwicklung rekonstruiert werden. Durch diese Mutation, resp. durch eine irreversible Entmischung wird eine Zelldeszendenz eindeutig markiert, und es muß möglich sein, mit Hilfe solcher Markierungen die Entwicklungsgeschichte zu bestimmen, so nur eine genügend große Anzahl solcher Markierungen vorliegt. Die Zahl der gescheckten Blätter der Pflanze 1956.1323.82 genügt dazu nicht in allen Fällen, doch reicht sie aus, um festzustellen, daß die Blattentwicklung der Pflanze 1956. 1323. 82 sich nicht wesentlich von der Blattentwicklung einer größeren Gruppe von Schecken unterscheidet, die nun so viel gescheckte Blätter liefert, daß eine Untersuchung der Blattentwicklung an Hand der Scheckungsmuster möglich ist. Drei Prinzipien sind dabei von Wichtigkeit, wobei hier nur die Markierung durch zufallsgemäße Plasmonentmischung (zufallsgemäße Fleckenanordnung!) berücksichtigt sei. 1. Wiederholt sich ein Muster in zwei Organen (z. B. in übereinander stehenden Blättern) oder in zwei benachbart liegenden Gewebeschichten in einer Häufigkeit, die das zufällige Zusammentreffen mehrfacher Entmischungen überschreitet, so gehören beide Organe, resp. Gewebe einer einheitlichen Zelldeszendenz an. Die im Einzelfall beobachtete Abänderung muß vor der Trennung der einander entsprechenden Teildeszendenzen erfolgt sein. In den Einzelfällen, in denen dasselbe Muster sich aber in den benachbarten Organen nicht gleicht, muß die Abänderung während oder nach der Trennung der Teildeszendenzen entstanden sein. 2. Die Ausdehnung des Musters ist von dem Zeitpunkt seiner Anlage abhängig. Größere Flecken werden in einem gleichmäßig wachsenden Organ früher angelegt als kleinere Flecken. 3. Durch die Analyse der Blattmuster können nur Aussagen über die Entwicklung der die Muster tragenden Blattlamina gemacht werden. Die Entwicklung z. B. der Blattrippe bleibt unbekannt. Bei Anwendung dieser Prinzipien ergibt sich in großen Zügen folgende Entwicklungsgeschichte der *Epilobium*-Lamina.

Die größten abgeänderten Zellflächen sind ganze Blätter und Blatthälften. In einer das zufällige Zusammentreffen weit überschreitenden

Häufigkeit der Fälle wiederholen sich z. B. weiße Blatthälften in übereinanderstehenden Blattwirteln (vgl. Abb. 6). Sie gehören also einer einheitlichen Zelldeszendenz an und sind aus abgeänderten Sektoren des Sproßvegetationspunktes entstanden. Dasselbe gilt für die Blattöhrchen der stengelumfassenden *Epilobium*-Blätter. Man kann Blatthälften und Blattöhrchen daher als Grundsektoren des Blattes bezeichnen. Jedes *Epilobium*-Blatt ist also aus zwei, bei stengelumfassenden Blättern aus vier nebeneinanderliegenden (Abb. 10) Grundsektoren zusammengesetzt, die auf verschiedene, voneinander unabhängige Zelldeszendenzlinien des Sprosses zurückgehen.

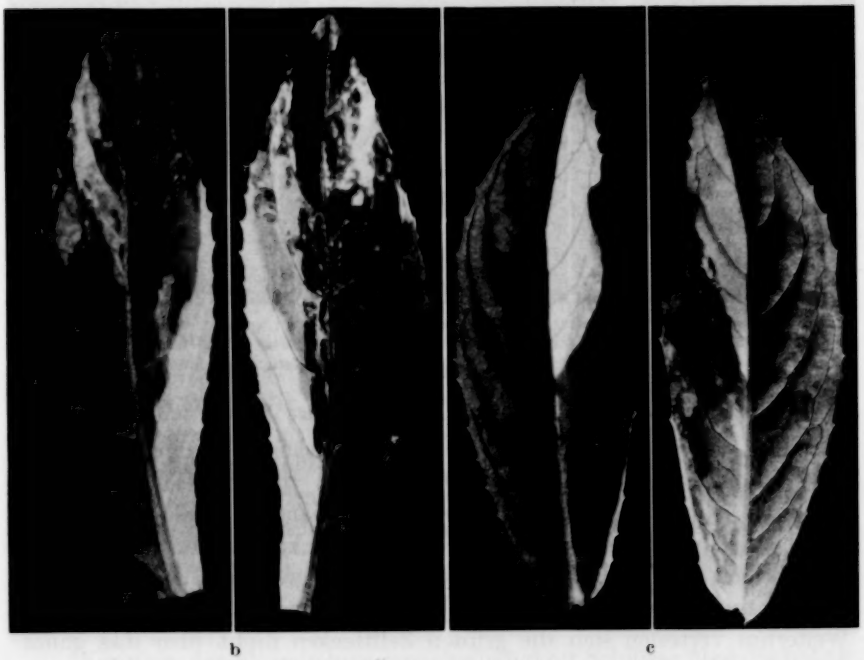
Alle übrigen, kleineren Zellflecken wiederholen sich nie in übereinander stehenden Blättern. Sie sind also nach der Trennung der übereinanderstehenden Blattwirtel entstanden. Mit der Anlage dieser kleineren Flecken beginnt die eigentliche Blattentwicklung. Nach der Fleckengröße lassen sich, leicht schematisierend, bei der Entwicklung der *Epilobium*-Lamina mehrere Zellteilungsperioden unterscheiden, die sich leicht überschneiden können. Hier interessieren nur die drei ersten Perioden.

In der ersten Teilungsperiode werden die Grundinitialen der Laminahälften durch mehrere Wände geteilt, die alle ± parallel zu den späteren Seitennerven erster Ordnung verlaufen und die die Blatthälften in eine Reihe von 5—10 fiederförmig angeordneten „Primärsektoren" aufteilen (Abb. 8). Aus der Häufigkeit, mit der nebeneinander liegende Primärsektoren in gleicher Weise abgeändert sind, läßt sich die Reihenfolge der eingezogenen Wände bestimmen (Abb. 10). Für diese Zellteilungsperiode sind mindestens 3, höchstens 4—9 Zellteilungsfolgen einzusetzen, je nachdem, ob sich alle Zellen gleichmäßig weiter teilen oder ob einzelne Zellen ungeteilt bleiben.

Erfolgt während dieser Teilungen eine Abänderung, so reicht sie in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle von der Epidermis der Blattoberseite bis zur Epidermis der Blattunterseite durch die ganze Blattlamina hindurch. Das Parenchym der *Epilobium*-Blattlamina geht also in der Regel aus *einer* Zellage der hypodermalen Schicht hervor. Von 66 an der Pflanze 1956.1323.82 aufgetretenen weißen Primärsektoren hatten 62% auf Blattober- und -unterseite eine gleichartige Fleckenbegrenzung (Abb. 8). Sie entstanden, bevor die hypodermale Schicht parallel zur Blattfläche geteilt wurde. Bei 38% der Primärsektoren waren Blattober- und -unterseite verschieden gefleckt. Sie entstanden z.T. nach der Ausbildung der Mehrschichtigkeit der Parenchyme. Alle kleineren Flecken, in die die Primärsektoren weiter aufgeteilt werden, greifen nicht mehr durch die ganze Blattlamina hindurch und sind auf Blattober- und -unterseite verschieden. Inzwischen ist also die Blattlamina in einer zweiten Teilungsperiode in mindestens zwei Zell-Lagen aufgeteilt worden. Zur Herausbildung der Mehrschichtigkeit der Blatt-

lamina sind 2—3 Zellteilungsfolgen einzusetzen. Dieser zweiten Teilungsperiode folgt das eigentliche Flächenwachstum der Blattlamina.

a



b c

Abb. 8 a—c. Drei gescheckte Blätter mit abgeänderten „Primärsektoren". Von jedem Blatt sind die Ober- und Unterseite wiedergegeben, um zu zeigen, daß die „Primärsektoren" durch die ganze Blattdicke hindurchreichen. a In der stark gescheckten Blatthälfte liegt zu unterst ein weißes Blattöhrchen (Grundsektor!). Es folgen 1—2 grüne, resp. schwach gescheckte Primärsektoren und 1—2 rein weiße Primärsektoren. Der oberste Primärsektor ist stark gescheckt, der korrespondierende Spitzensektor der anderen Blattseite ist rein weiß und reicht wieder durch die ganze Blattlamina hindurch. b An der Basis ein rein weißes Blattöhrchen und ein zufällig anschließender weißer Primärsektor. Es folgen 1—2 Primärsektoren, in denen die Flecken, die teils in der dritten, teils in den folgenden Teilungsperioden entstanden, nicht mehr durch das Blatt hindurchreichen. Der Spitzensektor ist beiderseits grün. c Blattöhrchen (Grundsektor!) rein weiß. Die Sektoren der unteren Blatthälfte sind nur auf der Unterseite gescheckt, die Spitzensektoren sind rein weiß

In der dritten Teilungsperiode werden nun die Primärsektoren durch Wände aufgeteilt, die wieder senkrecht zur Blattoberfläche stehen und

meistens ± parallel der Mittelrippe eingezogen werden (Abb. 9, 10). Auf eine Laminahälfte fallen Reihen von 3—8 solcher „Tertiärsektoren", für die mindestens 2, höchstens 7 Zellteilungsfolgen benötigt werden. Über die weiteren Zellteilungen lassen sich wegen der unregelmäßigen Anordnung der Zellwände schwer allgemeinere Gesetzmäßigkeiten ableiten. Über Schätzungen der Zahl der Zellteilungsfolgen, die in den Tertiärsektoren ablaufen, wird später zu berichten sein.

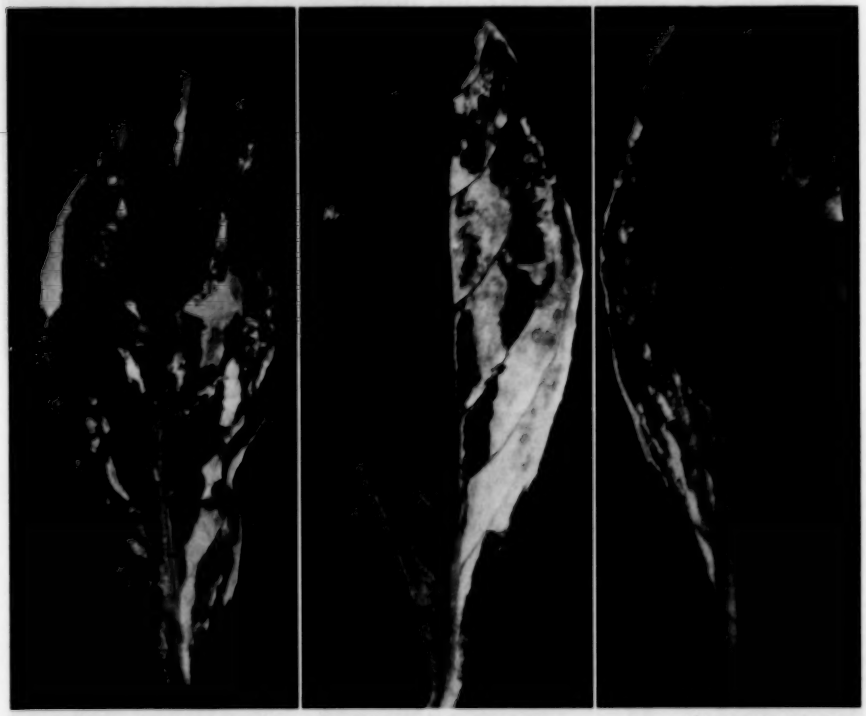


Abb. 9. Zwei Blätter, in denen die Entmischungen zu einem großen Teile während der dritten Teilungsperiode stattfanden. Das rechte Blatt ist von Ober- und Unterseite wiedergegeben. Die Fleckung ist auf beiden Seiten verschieden

4. Der Ort der Neumutation bei Pflanze 1956.1323.82

Mit diesen entwicklungsgeschichtlichen Vorgängen ist nun das Muster der Neumutation der Pflanze 1956.1323.82 zu vergleichen. Rückmutierte, grüne Zellen kommen ausschließlich auf einer Fläche vor, wie sie üblicherweise einem einzelnen Primärsektor zukommen würde. Auf der übrigen weißen Blattlamina sowie in den weißen Blatthälften der darüber und darunter stehenden Blätter fehlen grüne Zellen vollständig. Weiterhin verteilen sich die grünen Zellflecken nicht über das ganze Areal des Primärsektors, sondern sind auf die der Mittelrippe zunächst liegenden 1 bis höchstens 3 Tertiärsektoren der Blattunterseite be-

schränkt. Schließlich kommen die grünen Zellen nur in der einen Schicht der Blattunterseite vor, in der dann die weiteren Teilungen parallel der Blattfläche ausgefallen sind. Unter diesen Bedingungen wird die erste Aufteilung der mutierten Erbträger auf verschiedene Zellen während der ersten Teilungen der dritten Teilungsperiode stattgefunden haben. Die eigentliche Mutation könnte zum selben Zeitpunkt erfolgt sein, könnte aber auch frühestens in den letzten Teilungen der ersten Teilungsperiode erfolgt sein. Am wahrscheinlichsten erscheint eine Mutation nach der ersten Aufteilung der hypodermalen Schicht in Blattober- und Blattunterseite. Damit wäre der Ort der Neumutation verhältnismäßig genau bestimmt. Der Fall liegt besonders günstig, denn einerseits er-

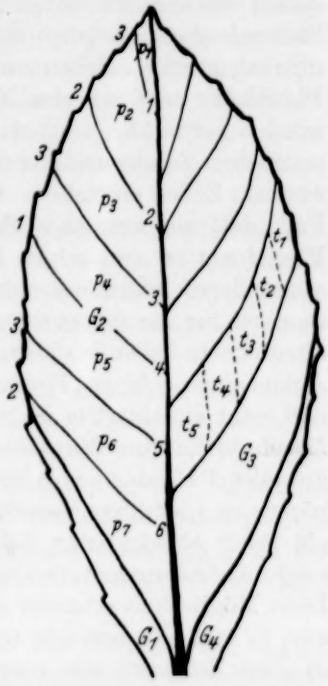


Abb. 10. Vorläufiges Schema der Entwicklung des *Epilobium*-Blattes. G_1—G_4 Grundsektoren (Anteile der im Sproßvegetationspunkt verlaufenden Zelldeszendenzen), p_1—p_n Primärsektoren, t_1—t_n Tertiärsektoren. Bei der Einziehung der Wände sind prinzipiell zwei verschiedene Teilungsmodi, resp. eine Kombination beider möglich. Eine Mindestzahl von Zellteilungsfolgen wird benötigt, wenn sich alle Zellen gleichmäßig teilen (Randzahlen der Reihenfolge der Zellteilungen der Primärsektoren). Eine Höchstzahl von Zellteilungsfolgen wird benötigt, wenn stets eine der beiden Tochterzellen ungeteilt bleibt (Zahlen der Reihenfolge der eingezogenen Wände neben der Mittelrippe für das Beispiel einer basalen Wachstumszone). Im ersteren Falle sind besonders häufig z. B. die Primärsektoren p_1—p_4 und p_5—p_7 gleichartig gemustert. Im zweiten Falle ist besonders häufig z. B. p_1—p_7, p_2—p_7, p_3—p_7, p_4—p_7 usw. gleichartig gemustert, während eine gleichartige Musterung von z. B. p_1—p_4 höchstens durch zufälliges Zusammentreffen mehrerer Entmischungen entstehen kann und dementsprechend selten sein muß

folgt die erste Entmischung im Blatt so spät, daß vor ihr zum mindesten 4—5 Zellteilungsfolgen im Blatt abliefen. Die Mutation muß auf alle Fälle im Blatt selbst stattgefunden haben. Andererseits erfolgte die Mutation so frühzeitig, daß die von der mutierten Zelle ausgehenden Zelldeszendenzlinien genügend Zellteilungsfolgen durchliefen, um sicher zu einer Entmischung kommen und eine genügend große Zahl von Entmischungsflecken bilden zu können. Schließlich erleichtert die Einschichtigkeit der grünen Gewebe sowohl eine Bestimmung der Zellzahl als auch eine genaue Untersuchung aller Einzelzellen in erheblichem Maße.

V. Über die Wirkungsweise der mutierten Erbträger

Wenn aus der Entmischungsgeschwindigkeit Schlüsse über die Lokalisation der mutierten Erbträger gezogen werden sollen, so muß die

Wirkungsweise der mutierten Erbträger bekannt sein. Bei *albomaculatum*-Pflanzen ohne Mischzellen wird die Abänderung des Gesamtplastidoms von den Wirkstoffen der auf das Plastidom Einfluß nehmenden Erbträger bestimmt. Dabei sind vier Möglichkeiten gegeben. a) Es kommt schon der ganze Effekt zustande, wenn einer von vielen Erbträgern mutiert ist (mit „Dominanz" eines mutierten „Allels" vergleichbar). In diesem Falle wird schon das Plastidom der Zelle abgeändert werden, die durch Mutation eines von zahlreichen Erbträgern heteroplasmonisch geworden ist. Heteroplasmonische und homoplasmonisch mutierte Zellen unterscheiden sich nicht. Die Abänderung des Plastidoms tritt mit der Mutation auf, und die anschließenden Entmischungsvorgänge sind nur dann kenntlich, wenn aus der heteroplasmonischen Zelldeszendenz der mutierten Zelle wieder homoplasmonisch normale Zellen entstehen. b) Im absoluten Gegensatz hierzu steht der Fall, daß ein normaler Erbträger genügt, um die Abänderung des Plastidoms zu verhindern („Dominanz" des normalen „Allels"). Ein abgeändertes Plastidom entsteht ausschließlich in Zellen, die homoplasmonisch für die mutierten Erbträger sind. In diesem Falle entstehen abgeänderte Zellen in einem zeitlichen Abstand nach der Mutation nach Ablauf einer $\pm$ langen Entmischungsperiode. c) Es ist weiterhin möglich, daß nicht ein einzelner Erbträger von vielen die Entscheidung über die Manifestation einer Mutation herbeiführt, sondern daß der Abänderungsgrad des Plastidoms von der Zahl der mutierten Erbträger je Zelle abhängig ist („additive Vererbung"). In diesem Falle entstehen nicht nur *ein* neuer abgeänderter Zelltyp neben normalen Zellen, sondern zahlreiche Abänderungsstufen und Übergänge zwischen mutiert und normal. Diese Möglichkeit scheidet zur Deutung der hier untersuchten Mutation aus, da hier nur normale und einheitlich abgeänderte Zellen auftreten. d) Zwei Zelltypen mit normalen und mutierten Plastiden können bei einer sich quantitativ addierenden Wirkung der Erbträger nur im Zusammenhang mit einer scharf ausgeprägten Reaktionsschwelle entstehen. In diesem Falle entstehen abgeänderte Zellen dann, wenn ein bestimmtes Mengenverhältnis von mutierten zu normalen Erbträgern überschritten wird. In allen geschilderten Fällen treten selbst bei ein und derselben Entmischungsgeschwindigkeit abgeänderte Zellen zu einem ganz verschiedenen Zeitpunkt auf. Eine Bestimmung der Entmischungsgeschwindigkeit ist also nur bei Kenntnis der Wirkungsweise der Erbträger möglich.

Über diese Wirkungsweise der Erbträger vermag die Analyse des Scheckungsmusters Aufschluß zu geben. Nehmen wir in dem Beispiel der Pflanze 1956.1323.82 an, daß schon die Mutation eines von zahlreichen Erbträgern zur Ergrünung der Zellen führte, so sind alle heteroplasmonischen Zellen grün. In den heteroplasmonisch grünen Zell-

leszendenzen erfolgen aber weitere Entmischungen, in deren Verlauf die mutierten Erbträger wieder eliminiert werden können. Es entstehen dann wieder homoplasmonisch weiße Zellen. Im Entmischungsmuster eines Blattes muß sich das so auswirken, daß inmitten grüner Blattflecken immer wieder mehr oder weniger große weiße Zellinseln auftreten. Solche weiße Zellinseln fehlen erst dann, wenn die gesamte Deszendenz der mutierten Zelle homoplasmonisch grün geworden ist. Hierzu sind durchschnittlich $n \cdot 10$ Zellteilungsfolgen nötig (P. MICHAELIS 1955b), wobei n die Zahl der maßgeblichen Erbträger je Zelle nach der Zellteilung ist. Die Heteroplasmonie bleibt also verhältnismäßig lange, zum mindesten in einzelnen Zelldeszendenzen erhalten und gibt sich immer wieder durch Abgabe weißer Zellen zu erkennen. Inmitten weißer Areale jedoch können grüne Flecken nur durch Neumutation entstehen, da farblose Zellen homoplasmonisch sind.

Nehmen wir umgekehrt an, daß bei der Pflanze nur homoplasmonisch mutierte Zellen grün sind, so muß ein Teil der weißen Zellen heteroplasmonisch sein, und es müssen innerhalb der weißen Areale stets wieder grüne Inseln auftreten, während weiße Inseln inmitten grüner Zelldeszendenzen fehlen.

Wird die Entscheidung über das Ergrünen der Zellen von einem bestimmten Mengenverhältnis normaler: mutierter Erbträger gefällt, so können sowohl grüne als auch weiße Zellen heteroplasmonisch sein. Es müssen sowohl innerhalb weißer Zellflächen grüne Zellinseln, als auch innerhalb grüner Zeilflächen weiße Zellinseln auftreten. Aus der Häufigkeit grüner und weißer Zellinseln müßte sich sogar das für die Ergrünung maßgebliche Verhältnis normaler: mutierter Erbträger bestimmen lassen.

Abb. 11 soll diese Verhältnisse demonstrieren. Die Abbildung läßt deutlich erkennen, daß das Auftreten und die Häufigkeit von abgeänderten Flächen einerseits von dem Entmischungsgrad (Vergleich der oberen und unteren Bilder) und andererseits von der Wirkungsweise der Erbträger (Vergleich der Bilder einer Reihe) abhängig sind. Die Abbildung zeigt weiterhin das Auftreten weißer Inseln inmitten schwarz (a, b) und schwarzer Inseln inmitten von weiß (b, c) in Abhängigkeit von der Wirkungsweise der Erbträger. Die Abbildung zeigt aber auch, daß bei einer solchen Betrachtung leicht Fehler entstehen, wenn man nicht die Lage der einzelnen Zelldeszendenzlinien berücksichtigt. In den z. B. von den Teilungsebenen 4′/0′ und 5′/3′ begrenzten Flächen der Abb. 11a oben scheinen nicht nur weiße Inseln inmitten von schwarz zu liegen, sondern auch einzelne schwarze Inseln von weiß umgeben zu sein. Es handelt sich hier jedoch um eine Täuschung. Die angeführten Regeln gelten nur für eine einheitliche Zelldeszendenz. Bei den geschilderten Abweichungen von der Regel grenzen jedoch zwei verschieden stark entmischte Zelldeszendenzen (Deszendenzgrenze 4′/6 und 3′) aneinander, wobei zufällig verschiedene Entmischungstypen nebeneinander zu liegen kommen. Um solche Täuschungen möglichst zu vermeiden, empfiehlt es sich, nur möglichst kleine Zellinseln von 1—4 Zellen zu berücksichtigen, die innerhalb einer einheitlichen Zelldeszendenz liegen.

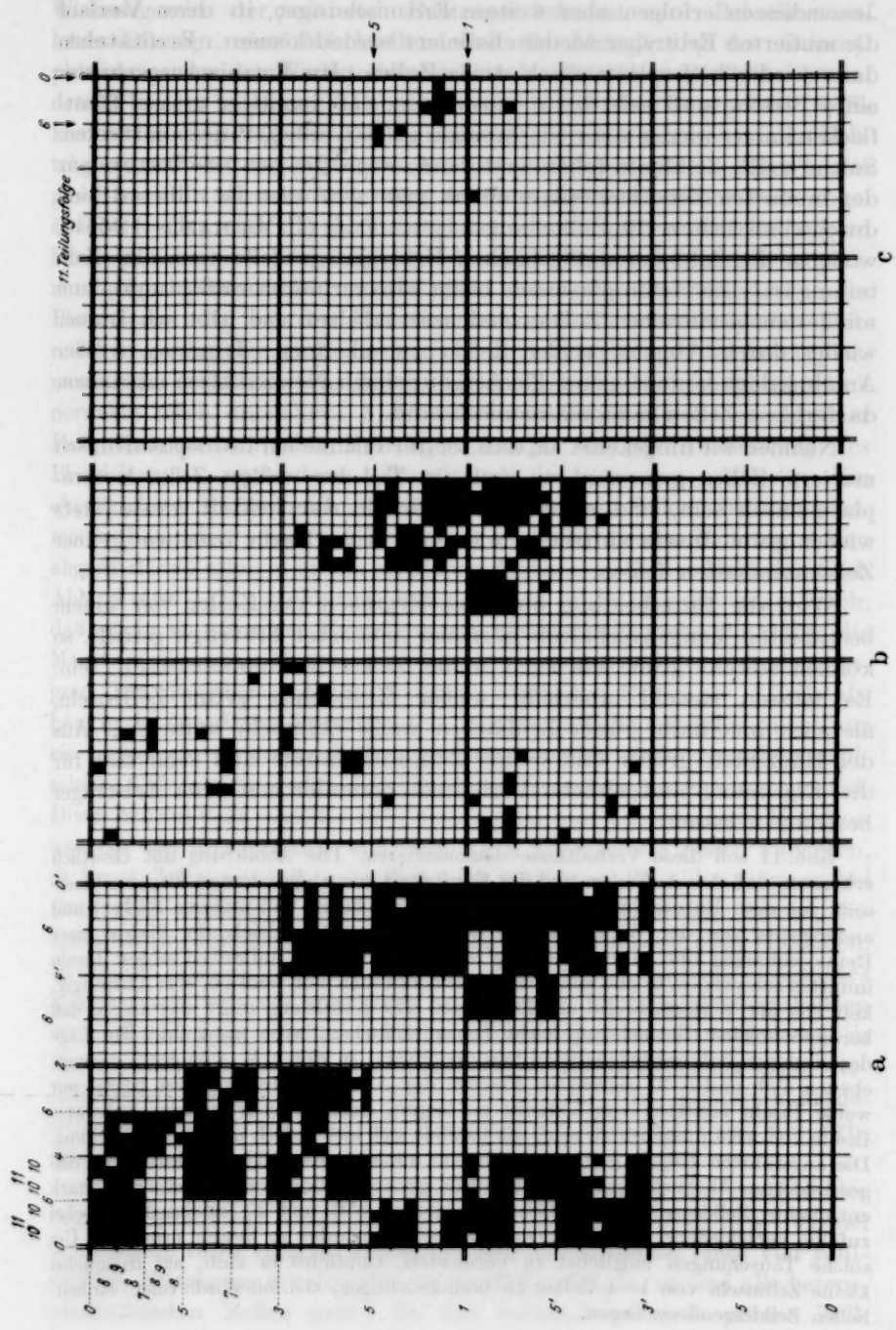

n. Teilungsfolge
c
b
a

Abb. 11 a—c. (Beschreibung s. S. 86)

Untersucht man das Entmischungsmuster der Pflanze 1956. 1323. 82, so läßt sich eindeutig feststellen, daß inmitten von „weiß" grüne Inseln liegen, echte weiße Inseln inmitten grüner Deszendenzen aber fehlen. Man darf hier also annehmen, daß alle grünen Zellen homoplasmonisch mutiert sind und die heteroplasmonischen Zellen in den weißen Arealen zu suchen sind. Die weiteren Überlegungen sind auf dieser Grundlage durchzuführen.

VI. Die Entmischungsgeschwindigkeit der mutierten Erbträger

Die Entmischungsgeschwindigkeit der mutierten Erbträger läßt sich bestimmen, wenn es gelingt, die Zahl der abgeänderten Blattflecken festzustellen und den Zeitpunkt festzulegen, wann die erste abgeänderte, d. h. homoplasmonisch grüne Zelle jedes Fleckes entstanden war.

Es bereitet nicht allzu große Schwierigkeiten, die Fleckenzahl zu bestimmen, wenn die entwicklungsgeschichtlichen Abläufe im Blatt übersehbar sind. Es muß nur berücksichtigt werden, daß ein größerer, unregelmäßig geformter Fleck aus mehreren Entmischungsflecken zusammengesetzt sein kann, wenn zufällig Entmischungen verschiedener Zelldeszendenzlinien nebeneinander zu liegen kommen.

Schwieriger ist die Bestimmung des Zeitpunktes, zu dem die erste abgeänderte Zelle des Fleckes entstand. Ein relatives Maß für den Zeitpunkt der Fleckenanlage ist die Größe der einzelnen Flecken und die Zahl der in jedem Fleck liegenden Zellen.

Zur Bestimmung wurden in allen grünen Arealen die Zellen in zahlreichen, sich überschneidenden Bildern photographiert und an den Photographien die Zellen gezählt. Diese Zählungen wurden dadurch sehr erleichtert, daß die grünen Zellen der Schecke 1956.1323.82 sehr groß und einheitlich geformt waren und daß sie alle in einer Schicht lagen (Abb. 7).

Um die auf diese Weise erhaltenen Zahlen auswerten zu können, war es notwendig, die Beziehungen zwischen Zellzahl der Einzelflecken und Zahl der Zellteilungsfolgen, die zur Bildung der Flecken benötigt wurden, zu untersuchen. Es waren die entwicklungsgeschichtlichen Vor-

Abb. 11a—c. Darstellung eines Modellversuches, der die Entstehung der Muster bei verschiedenen Wirkungsweisen der Plasmagene erläutern soll. In dem Modellversuch lagen in einer Urne 10 weiße Kugeln, von denen 1 Kugel zu „grün" mutiert war. Es wurde die Zahl der weißen und grünen Kugeln verdoppelt, die Kugeln gemischt und zufallsgemäß halbiert. Mit den neuen Mischungsverhältnissen wurde der Versuch wiederholt und in dieser Weise über 11 Teilungsfolgen fortgeführt. Die erhaltenen 2048 Werte wurden in ein der Blattentwicklung ungefähr nachgebildetes Muster eingetragen, und dasselbe Muster wurde unter folgenden drei Annahmen ausgezeichnet. Abb. 11 oben: a 1—10 mutierte Erbträger je Zelle = grünes Plastidom (Zelle schwarz ausgefüllt), 0 mutierte Erbträger = weißes Plastidom (Zelle weiß). b 5—10 mutierte Erbträger = grünes Plastidom, 0—4 mutierte Erbträger = weißes Plastidom. c Alle 10 mutierten Erbträger = grünes Plastidom, 0—9 mutierte Erbträger = weißes Plastidom. Die Zahlen am Rande des Musters geben die Lage der einzelnen Teilungsebenen an. — In Abb. 11 unten ist die Entmischung des in der oberen Zeichnung von Zellteilungsfolge 0, 6, 5 und 1 begrenzten Entmischungsabschnittes (vgl. c) bis zur 17. Teilungsfolge fortgeführt und unter denselben Bedingungen ausgezeichnet worden

gänge genauer zu analysieren, die, in den einzelnen Tertiärsektoren ablaufend, das Flächenwachstum des Blattes bedingen.

1. Über die Zellteilungsrhythmen während des Flächenwachstums der Epilobium-Blattlamina

Teilen sich alle Zellen der jungen *Epilobium*-Blätter gleich oft, so wird mit jeder Zellteilung die Zahl der Zellen verdoppelt. Es müßten sich in diesem Falle die Zellzahlen der abgeänderten Flecken der Reihe 2^n (d. h. 1—2—4—8—16—32 usw., Tabelle 3, Spalte 2) einordnen lassen. Wenn ein bestimmter Anteil der Zellen im Verlauf der einzelnen Zellteilungsfolgen ungeteilt bleibt, so treten charakteristische Abweichungen von der Reihe 2^n auf. Besteht keine Ordnung während der Zellteilungsabläufe, so müssen beliebige Zahlen anzutreffen sein.

Zur Untersuchung dieser Verhältnisse wurden zuerst die Zellflecken ausgewachsener Blätter von verschiedenen *albomaculatum*-Pflanzen herangezogen. Bei ihnen kann keine Verwechslung verschiedener Zelldeszendenzen stattfinden. Zur Untersuchung wurden Schecken verwendet, bei denen die Abänderung des Plastidoms erst nach Abschluß der Teilungen manifest wurde und bei denen durch die Abänderung der Plastiden der Teilungsrhythmus der Zellen nicht gestört wurde.

Für einen solchen normalen Teilungsablauf gibt es mehrere Indizien: Teilungsstörungen im Gewebe früh ausbleichender Schecken führen zu Blattverkrümmungen, die Zellzahl ist bei Scheckung in verschieden schnell wachsendem Gewebe je Flächeneinheit verschieden, ebenso die Größe der Zellen und der Intercellularen. Kleine Zellgruppen und Einzelzellen, die sich weniger oft teilen, werden durch das Wachstum der umliegenden normalen Zellen in deren Wachstumsrichtung in sehr kennzeichnender Weise verzogen.

Das größte Zahlenmaterial fiel bei einigen Schecken an, in denen die grünen Zellen heteroplasmonisch waren und bei denen im Laufe der Entmischungen inmitten grünen Gewebes immer wieder weiße Zellinseln entstanden. Bei solchen kleineren Zellinseln lassen sich die Zahl und Anordnung der Zellteilungsfolgen meistens ohne Schwierigkeiten aus der Lage der Zellen, aus der Anordnung der mit Tüpfeln versehenen Berührungsflächen und aus der Form der Intercellularen rekonstruieren (Abb. 12).

Die Untersuchung dieser im Blatt zuletzt abgelaufenen Zellteilungsfolgen ergab, daß sich in der Mehrzahl der Fälle die Zellen gleich oft geteilt hatten. Zellgruppen mit 1, 2, 4, 8 und 16 Zellen waren besonders häufig (Abb. 12a). Es bestehen also im Blatt bestimmte Gesetzmäßigkeiten, die offenbar so zu verstehen sind, daß sich die Mehrzahl der Zellen während der Blattentwicklung, wenn auch nicht gleichzeitig, so doch gleich oft teilt. Andererseits kamen aber doch Abweichungen von der Zahlenreihe 2^n vor, die zeigen, daß gelegentlich einzelne Zellen sich sich nicht dem allgemeinen Teilungsschema eingefügt hatten und ungeteilt liegengeblieben waren (Abb. 12b). Durch ein solches gelegentliches Liegenbleiben einzelner Zellen entstehen während der letzten

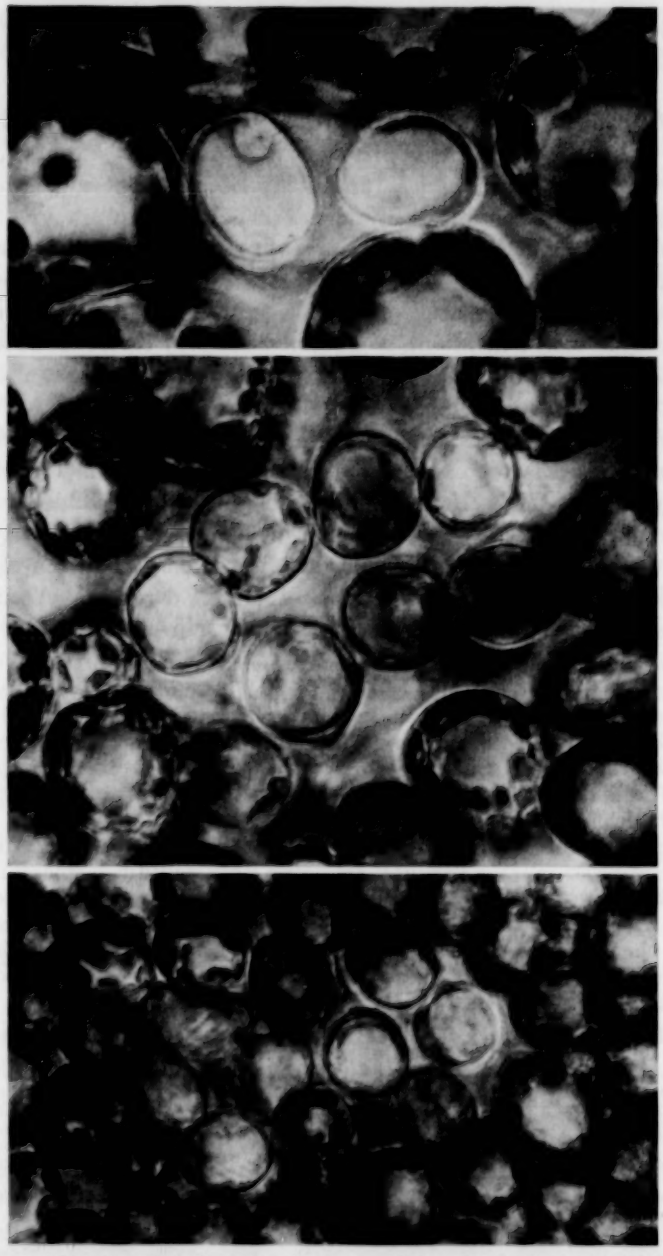


Abb. 12a Abgeänderte Zellgruppen bei gleicher Teilungshäufigkeit der Zellen. Oben: Mit der zweitletzten Teilung der Palisadenzellen entstand eine abgeänderte Zelle, die sich in der letzten Zellteilung verdoppelte. Mitte: Achtzellige Gruppe mit ausbleichendem Plastidom. Die erste abgeänderte Zelle entstand mit der viertletzten Teilungsfolge der Palisadenschicht. Die Teilungsebene der drittletzten Teilung verlief im Bild von links nach rechts, die Ebenen der beiden letzten Teilungen senkrecht dazu. Unten: Zwei benachbart liegende Zellgruppen mit je vier abgeänderten Zellen

Teilungsfolge zwischen Zweiergruppen Einzelzellen, durch Liegenbleiben einzelner Zellen in der vorletzten Teilung können statt vierzelliger Gruppen dreizellige, durch Liegenbleiben in den beiden letzten Teilungen ein- bis dreizellige Gruppen entstehen. In der drittletzten Zellteilung

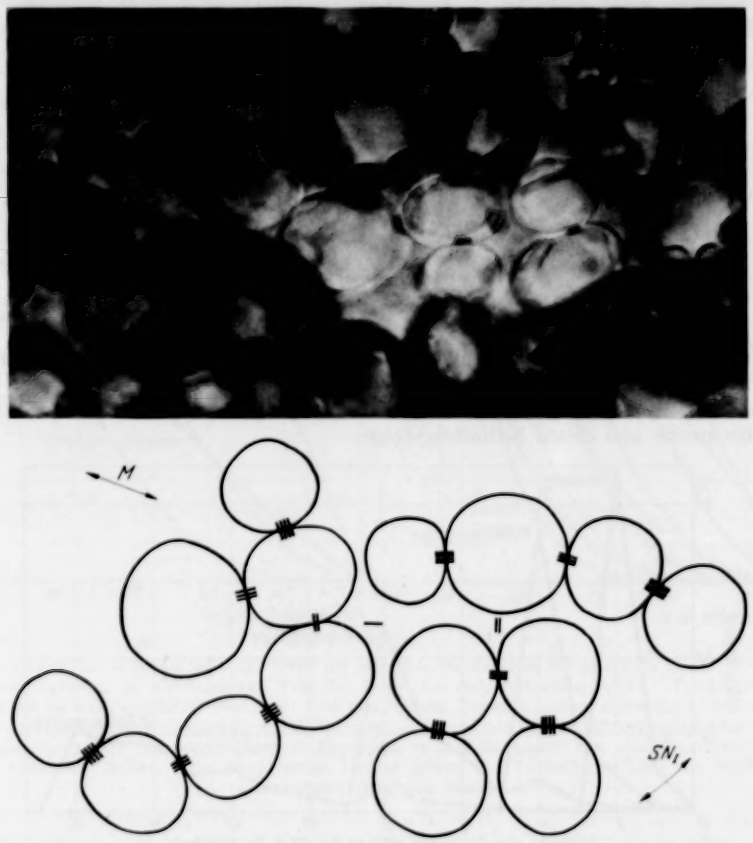
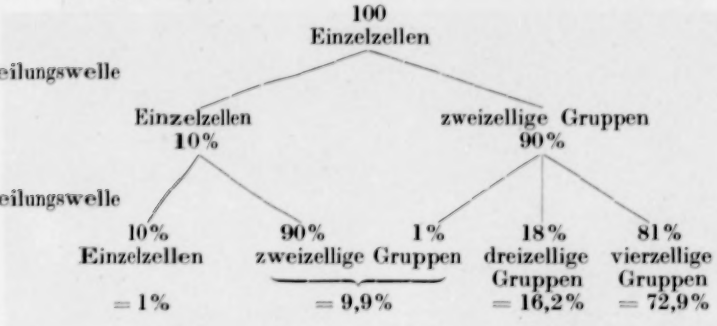


Abb. 12 b. Abgeänderte Zellgruppen mit ungleicher Teilungsfolge. Oben: Gruppe aus vier Zellen, von denen sich die beiden rechten Zellen in der letzten Teilungsfolge des Blattes allein nochmals teilten und damit eine sechszellige Gruppe bildeten. Unten: Zeichnung einer 15zelligen Gruppe mit ausbleichendem Plastidom, die inmitten normaler Palisadenzellen lag. Alle Zellen teilten sich gleich oft bis auf die große Zelle links oben, bei der die letzte Zellteilung ausfiel. Die Zahl der verbindenden Querstriche gibt die vermutliche Reihenfolge der Zellteilungen wieder

können an Stelle von achtzelligen Gruppen ein- bis siebenzellige entstehen. Um nun die Größe der Abweichungen kennenzulernen und in ihrer Bedeutung abschätzen zu können, war es notwendig, zu berechnen, in welcher Häufigkeit die einzelnen Zellgruppen zu erwarten sind, wenn ein bestimmter Prozentsatz von Zellen bei den einzelnen Teilungen ungeteilt liegenbleibt. Mit diesen errechneten Häufigkeiten sind dann die beobachteten Häufigkeiten zu vergleichen.

Im folgenden sei als Beispiel angenommen, daß von 100 Zellen sich bei jeder Zellteilungsfolge 90 Zellen teilen und 10 ungeteilt bleiben. Es wird noch zu zeigen sein, daß solche Verhältnisse für den Teilungsablauf im Blatt der untersuchten *Epilobium*-Sippen ungefähr zutreffen. Es entstehen unter diesen Bedingungen folgende Häufigkeiten:



In Abb. 13 sind diese Berechnungen bis zur vierten Teilungsfolge fortgeführt und graphisch dargestellt worden. Abb. 14a und b zeigt die Häufigkeit der einzelnen Zellgruppen in Abhängigkeit von der Zahl der ungeteilt bleibenden Zellen für die zweite und dritte Zellteilungsfolge.

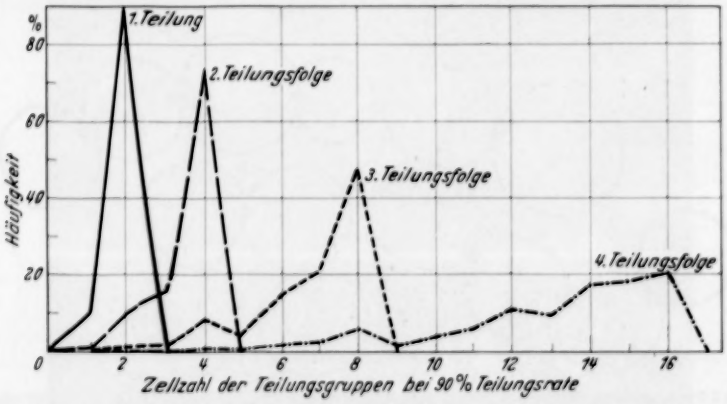


Abb. 13. Kurven der in der ersten bis vierten Zellteilungsfolge zu erwartenden Häufigkeiten verschiedenzelliger abgeänderter Zellgruppen, wenn die Häufigkeit der sich nicht teilenden Zellen 10% beträgt

Aus den auf solche Weise errechneten Zahlen lassen sich folgende allgemeinere Gesetzmäßigkeiten ableiten: In den ersten Zellteilungsfolgen treten die einzelnen Zellgruppen in Zahlenverhältnissen auf, die sich in sehr kennzeichnender Weise unterscheiden, wenn verschiedene Prozentsätze der Zellen ungeteilt liegenbleiben. Wenn es nicht möglich ist, die Zellteilungsvorgänge im Blatt laufend zu untersuchen, so kann man sie also aus den Zellgruppierungen erschließen. Die Kurven dieser charakteristischen Zahlenunterschiede gleichen sich zwar mit zunehmen-

den Teilungsfolgen immer mehr aus. Es entstehen Zellgruppen mit allen möglichen Zellzahlen. Es bleiben aber doch gewisse Gesetzmäßigkeiten erhalten. Die für die erste Teilungsfolge kennzeichnenden einzelligen und zweizelligen Gruppen und die für die zweite Teilungsfolge kennzeichnenden drei- und vierzelligen Gruppen können auch noch nach Ablauf weiterer Teilungsfolgen auftreten, sie werden aber in demselben

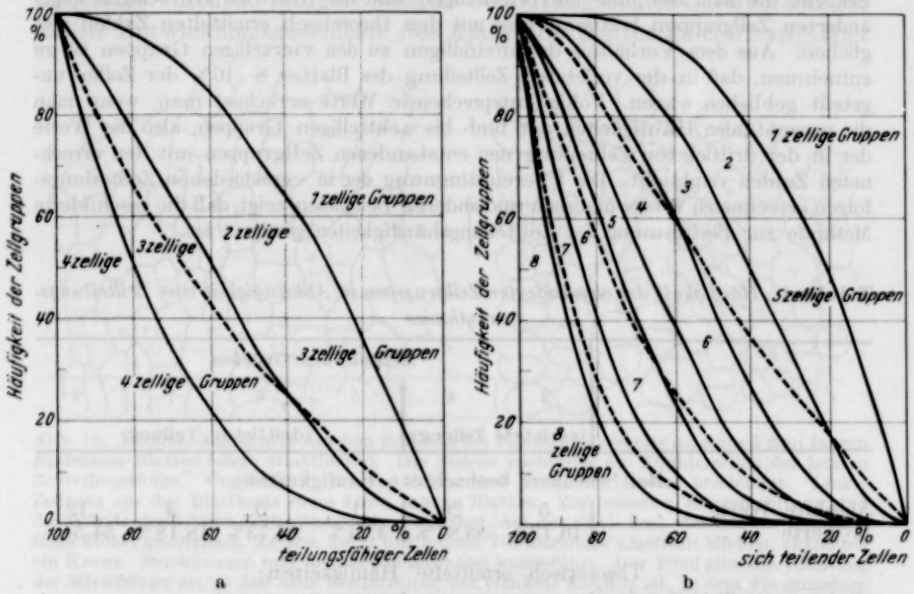


Abb. 14a u. b. a Häufigkeit der Zahl der ein- bis vierzelligen Zellgruppen in der zweiten Zellteilungsfolge in Abhängigkeit von der Rate der sich teilenden Zellen. Punktiert gezeichnet ist das Verhältnis der drei- und vierzelligen Gruppen ohne Berücksichtigung der ein- und zweizelligen Gruppen. — b Häufigkeit der Zahl der in der dritten Zellteilungsfolge entstandenen ein- bis achtzelligen Zellgruppen in Abhängigkeit von der Häufigkeit der sich teilenden Zellen. Die punktierten Linien geben die Verhältniszahlen der fünf- bis achtzelligen Gruppen wieder

Maße seltener, wie Zellen von der Teilung ausgeschlossen werden. Ist z. B. das Verhältnis von ungeteilt liegenbleibenden Zellen zu sich teilenden Zellen wie 1/10 zu 9/10, so sinkt die Häufigkeit der Einzelzellen mit der zweiten Teilungsfolge von 10% auf 1%, mit der dritten und vierten Teilungsfolge auf 0,1%, resp. 0,01%. Die Häufigkeit der Zweiergruppen, die nach der zweiten Teilung 9,9% war, sinkt mit der dritten und vierten Teilungsfolge auf 0,999%, resp. 0,0999% usw. Dabei verändert sich das in den ersten Teilungen zustande gekommene Verhältnis der einzelnen Gruppen untereinander nur unwesentlich. Das in der zweiten Teilung entstandene Verhältnis von drei- und vierzelligen Gruppen von 18:82 verschiebt sich in den folgenden Teilungen kaum, wenn der Anteil der sich nicht teilenden Zellen 10% bleibt. Es kann

also aus diesem relativen Verhältnis der Anteil der ungeteilt bleibenden Zellen abgeschätzt werden, ohne daß bekannt zu sein braucht, in welcher Zellteilung die einzelnen Zellgruppen entstanden sind. Nur bei einem wesentlich höheren Prozentsatz sich nicht teilender Zellen sind größere Korrekturen notwendig.

In Tabelle 4 ist eine solche Berechnung durchgeführt. Es wurden bei einer Schecke die Zahl der drei- und vierzelligen und der fünf- bis achtzelligen abgeänderten Zellgruppen bestimmt und mit den theoretisch ermittelten Zahlen verglichen. Aus dem Verhältnis der dreizelligen zu den vierzelligen Gruppen ist zu entnehmen, daß in der vorletzten Zellteilung des Blattes 8—10% der Zellen ungeteilt geblieben waren. Völlig entsprechende Werte errechnet man, wenn man die prozentualen Häufigkeiten der fünf- bis achtzelligen Gruppen, also die Werte der in der drittletzten Zellteilung neu entstandenen Zellgruppen mit den errechneten Zahlen vergleicht. Die Übereinstimmung der in verschiedenen Zellteilungsfolgen errechneten Werte in diesen und anderen Beispielen zeigt, daß die geschilderte Methode zur Bestimmung der Zellteilungshäufigkeiten geeignet ist.

Tabelle 4. *Häufigkeit der abgeänderten Zellgruppen in Abhängigkeit vom Zellteilungsrhythmus*

	Zellzahl der Gruppen					
	3	4	5	6	7	8
	(vorletzte Teilung)		(drittletzte Teilung)			
Bei Schecken beobachtete Häufigkeiten:						
Absolute Werte	5	26	1	5	4	12
%-Werte	16,13%	83,87%	4,54%	22,73%	18,18%	54,54%
Theoretisch ermittelte Häufigkeiten:						
% der ungeteilt bleibenden Zellen						
8%	14,81%	85,19%	3,18%	14,34%	21,28%	61,19%
9%	17,51%	83,49%	3,98%	15,86%	22,74%	57,47%
10%	18,18%	81,82%	4,74%	17,32%	23,98%	53,96%

Bei den Schecken lassen sich nur die kleineren abgeänderten Flecken für solche Auszählungen verwenden. Es können damit nur die Teilungsverhältnisse während der letzten im Blatt ablaufenden Zellteilungen untersucht werden, und es besteht die Notwendigkeit, die Methode auch auf normale Blätter und ihre verschiedenen Entwicklungsstadien zu übertragen. Im grünen Palisadengewebe ausgewachsener Blätter sind die entwicklungsgeschichtlichen Zusammenhänge meistens nicht mehr erkennbar. Im jungen, noch in Teilung befindlichen Palisadengewebe lassen sich aber an der Form und der Anordnung der Zellen zum mindesten die Teilungen der für den Zeitpunkt der Untersuchung zuletzt abgelaufenen Teilungsfolge ablesen. An sehr jungen Blättern mit noch weitgehend undifferenzierten Zellen lassen sich sowohl in den zukünftigen Palisaden- als auch in den Schwammparenchymschichten sogar die

Teilungsabläufe der letzten drei bis vier Zellteilungsfolgen mit Hilfe der Ausbildung und der Anordnung der Zellwände rekonstruieren (Abb. 15).

Mit Hilfe dieser Methode wurde 1. aus der relativen Häufigkeit der dreizelligen Gruppen die Teilungsrate der Zellen und 2. aus dem Winkel, den die eingezogenen Zellwände mit der Mittelrippe bilden, die zu den Teilungsebenen senkrecht stehende Wachstumsrichtung ermittelt (Abb. 16). Es kann hier nicht die Aufgabe sein, die Bedeutung solcher Untersuchungen für die Entwicklungsgeschichte des *Epilobium*-Blattes zu erörtern. Hier

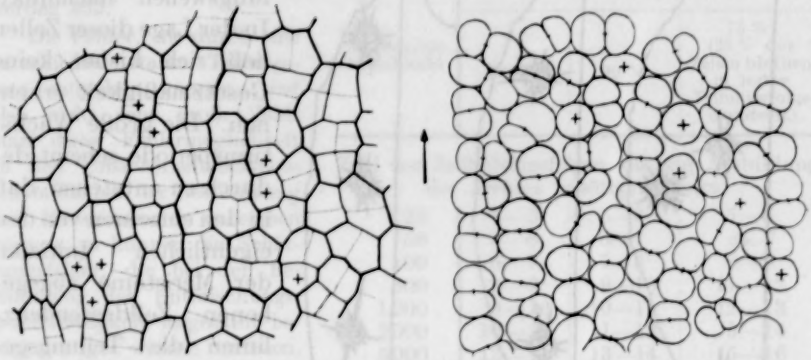


Abb. 15. Rechts: Ausschnitt aus dem Zellnetz des Palisadenparenchyms eines 3 mm langen *Epilobium*-Blattes (obere Blatthälfte). Die Striche verbinden die Tochterzellen der letzten Zellteilungsfolge. Ungeteilt gebliebene Zellen sind durch ein Kreuz bezeichnet. Links: Zellnetz aus der Blattbasis eines 9 mm langen Blattes. Zur besseren Kennzeichnung sind die Wände der letzten Zellteilungsfolge punktiert, die der dritt- und viertletzten Teilungsfolge dicker gezeichnet. Zellen, die in der letzten Teilungsfolge ungeteilt blieben, enthalten ein Kreuz. Zeichnungen mit dem Zeichenapparat ausgeführt. Der Pfeil gibt die Richtung der Mittelrippe an, so daß eine Bestimmung des Winkels möglich ist, in dem die einzelnen Zellwände eingezogen wurden

genügen folgende Ableitungen, die aber hier nicht weiter ausgebaut und untermauert werden können: Die charakteristische Form der *Epilobium*-Blätter kommt offenbar nicht dadurch zustande, daß an verschiedenen Orten und zu verschiedenen Zeiten unterschiedliche Prozentsätze von teilungsfähigen Zellen vorliegen. Die Blattform entsteht vor allem durch ein verschieden lang andauerndes Wachstum und durch die verschiedene Richtung der neu eingezogenen Zellwände. Die Zahl der dreizelligen Gruppen ist in verschiedenen Altersstadien und an verschiedenen Blattstellen sehr ähnlich und schwankt zwischen 5 und 12% (Mittel 8,4%). Die bisher durchgeführten Untersuchungen ließen in den verschiedenen Blatteilen keine gesetzmäßigen Unterschiede in der Zahl der liegengebliebenen Zellen erkennen; so überhaupt charakteristische Unterschiede vorhanden sind, können sie offenbar nicht sehr groß sein. Größere Störungen der Teilungsrate treten nur in kausaler Beziehung mit Verwundungen und Determinationsvorgängen auf, z. B. bei Anlage der Raphidenzellen und in unmittelbarer Nähe der Nerven und Spalt-

öffnungen. Obwohl sich die Zellen keineswegs gleichzeitig teilen, scheint insofern eine Gesetzmäßigkeit zu bestehen, als die Zellen sich in sehr ähnlichen Zeitabständen und daher während der Entwicklung ungefähr gleich oft teilen. Geringe Unterschiede im Zeitpunkt der Zellteilungen scheinen nur dadurch zu entstehen, daß bei jeder Zellteilungsfolge ein überall sehr ähnlicher Prozentsatz von Zellen den allgemeinen Teilungswellen nachhinkt. In der Lage dieser Zellen ließ sich bisher keine Gesetzmäßigkeit erkennen. Die große Wachstumsperiode scheint dadurch zu entstehen, daß in den einzelnen von den eigentlichen Initialen der Meristeme abgegebenen Zelldeszendenzlinien die Teilungsgeschwindigkeit ganz allgemein abnimmt.

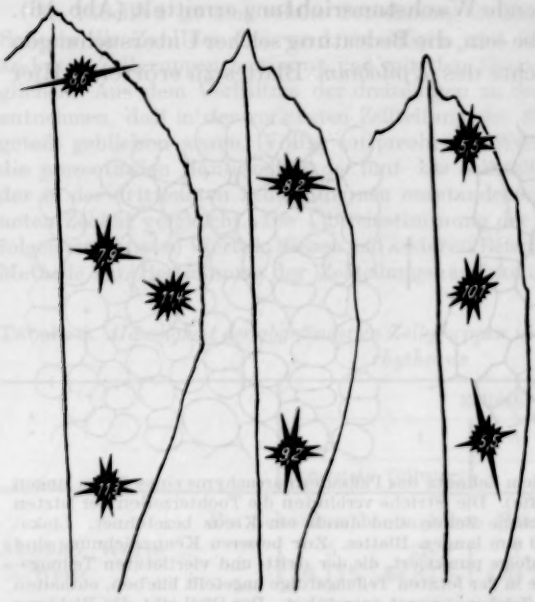


Abb. 16. Wachstumskoordinaten von drei verschieden alten Blättern. Links 14 mm langes Blatt der Sproßknospe, Mitte 9 mm langes Blatt, rechts 3,2 mm langes Blatt aus der Nähe des Vegetationspunktes. Die Lage des Koordinatensternes entspricht der Lage des untersuchten Blattgewebes. Die zentrale Zahl gibt den Anteil der während der zuletzt abgelaufenen Teilung liegengebliebenen Zellen an. Die Länge der Strahlen gibt den prozentualen Anteil der Zellwände an, die senkrecht zum Strahl eingezogen wurden. An der Spitze des 14 mm langen Blattes fand fast ausschließlich ein Breitenwachstum senkrecht zur Mittelrippe statt, an der Basis des 3,2 mm langen Blattes neben einem schwächeren Breitenwachstum hauptsächlich ein Längenwachstum

Im Rahmen der hier durchzuführenden Untersuchungen sind diese allgemeinen Gesetzmäßigkeiten insofern von Bedeutung, als man infolge der gleichartigen Beteiligung der Zellen an den Zellteilungsvorgängen mit ausreichender Genauigkeit aus der Zellzahl eines abgeänderten Areales den Zeitpunkt seiner Entstehung abschätzen kann. Ist der Prozentsatz der sich nicht teilenden Zellen 10%, so hat sich die Mehrzahl der Zellen eines Areales gleich oft geteilt. 10% der Zellen haben eine Teilungsfolge, 1% der Zellen haben zwei Teilungsfolgen, 0,1% der Zellen drei Zellteilungsfolgen übersprungen. In demselben Ausmaße können Fehler entstehen, wenn aus der Zahl der Zellen eines Areales dessen Alter bestimmt werden soll. In Tabelle 3 sind die Zellzahlen angegeben, die nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungsfolgen erwartet werden können, wenn keine Zellen, wenn 10%, 25% und 50%

der Zellen von jeder Zellteilung ausgeschlossen bleiben. Vergleicht man diese Zahlen, so findet man, daß der Unterschied der Zellzahlen bei verschiedener Teilungsrate im Verhältnis zu der Zunahme der Zellen mit jeder Zellteilung nicht groß ist.

Tabelle 5 zeigt den Einfluß verschiedener Zellteilungsraten, wenn aus der Zellzahl eines Areales sein Alter in Zellgenerationen angegeben werden soll.

Die Fehler, die durch eine verschieden starke Teilungsrate entstehen können, sind also nicht sehr groß. Zählt man diese Fehlermöglichkeit zu den Unsicherheitsfaktoren hinzu, die bei der Bestimmung des Mutationsortes entstehen können, so können die Schätzungsfehler, die bei der Bestimmung der Entmischungsgeschwindigkeit insgesamt berücksichtigt werden müssen, drei bis höchstens acht Generationenfolgen betragen.

Tabelle 5. *Beziehungen zwischen Arealgröße, Zellteilungsrate und Alter des Areales in Zellteilungsfolgen*

Arealgröße in Zellzahl	Zellteilungsrate		
	100 %	90 %	75 % (25 % der Zellen bleiben in jeder Teilungsfolge ungeteilt)
	Zahl der Zellteilungsfolgen, die zur Ausbildung des Areales benötigt wurden		
25	4—5	5—6	5—6
50	5—6	6—7	ca. 7
100	6—7	7—8	8—9
500	8—9	9—10	11—12
1000	9—10	10—11	12—13
2000	10—11	11—12	13—14
5000	12—13	13—14	15—16
10000	13—14	14—15	16—17
50000	15—16	16—17	19—20

2. *Die Entmischungsgeschwindigkeit der bei der Schecke 1956.1323.82 mutierten Erbträger*

Wie schon erwähnt, wurden an der Mutante der Pflanze 1956.1323.82 an Hand von Mikrophotographien die grünen Zellen ausgezählt. Es lagen insgesamt 21059 abgeänderte Zellen vor, die sich auf 39 selbständige Flecken verteilen. Der kleinste Fleck enthielt 12, der größte Fleck enthielt 5772 Zellen. Nach den Erörterungen des vorhergehenden Abschnittes müssen in dem kleinsten Fleck 4 Zellteilungsfolgen abgelaufen sein. Die erste homoplasmonisch mutierte Zelle des Fleckes muß zwischen der fünft- und viertletzten Zellteilungsfolge entstanden sein. Im größten Fleck dürften nach seiner Anlage noch ca. 14 Zellteilungsfolgen abgelaufen sein (vgl. Tabelle 3 und die oben besprochenen Fehlermöglichkeiten). In Abb. 18 sind auf analoge Weise die einzelnen Flecken auf die verschiedenen Zellteilungsfolgen verteilt worden.

Soll nun die Entmischungsgeschwindigkeit der mutierten Erbträger bestimmt werden, so sind die Zahlen der in den einzelnen Flecken stattgefundenen Zellteilungsfolgen mit der Gesamtzahl der Zellteilungsfolgen zu vergleichen, die in der von der primär mutierten Zelle abgehenden Zelldeszendenz abgelaufen sind. Es ist die Größe der grünen Flecken mit der Größe des Blattareales zu vergleichen, das aus der

mutierten Zelle entstand. Die Abgrenzung dieses Areales bereitet Schwierigkeiten, da sich die „weißen" Zellen, die von der mutierten Zelle wieder abgegeben wurden, nicht von den „weißen" Zellen der ursprünglichen Schecke unterscheiden lassen. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde einerseits ein Areal angenommen, das gerade alle grünen Zellen umschloß und in seiner Form der Mindestzahl der Tertiärsektoren entsprach (Abb. 17). Andererseits wurde ein Maximalareal angenommen, das von den Grenzen eines möglichst großen Primärsektors und einer Maximalzahl von Tertiärsektoren umschlossen wurde.

Abb. 17. Blattunterseite des abgeänderten Blattes der Pflanze 1956. 1323. 82 mit den abgeänderten grünen Zellflächen. Mit dichter Punktierung ist das Minimalareal umrissen und mit weiter Punktierung das Maximalareal angegeben, das wahrscheinlich aus der mutierten Zelle entstanden ist und den Berechnungen zugrunde gelegt wurde

Es war nicht möglich gewesen, die „weißen" Zellen des Maximal-, resp. Minimalsektors auszuzählen. Zudem lagen die „weißen" Zellen im Gegensatz zu den grünen Zellen in mehreren Schichten, was anzeigt, daß während der letzten Zellteilungsfolgen weiße und grüne Zellen sich in verschiedener Weise teilten und daher nicht vergleichbar waren. Es war zu überlegen, auf welche Weise am besten vergleichbare Zahlenwerte zu erhalten sind.

Da die grünen Flecken mit der größten und kleinsten Ausdehnung völlig gleiche anatomische Verhältnisse zeigen, so können die meristematischen „weißen" Zellen, aus denen grüne Areale enstanden, sich während der vierzehnt- und viertletzten Teilung nicht wesentlich anders verhalten haben als die meristematischen, später grün werdenden Zellen. Wenn am fertig ausgebildeten Blatt zwischen grünem und weißem Gewebe Unterschiede festzustellen sind, so müssen diese nach der viertletzten Teilung der später grün werdenden Zellen entstanden sein. Erst nach diesem Zeitpunkt müssen im weißen Gewebe noch Teilungen parallel der Blattfläche stattgefunden haben, die in den grünen Zellen ausfielen. Diese letzte periklinale Teilungsphase läßt sich mit Hilfe der Analyse der Scheckungsmuster ganz allgemein feststellen: Abgeänderte kleine Zellflecken aus wenig Zellen liegen stets nur in einer der Palisaden-, resp. Schwammparenchymschichten. Größere Flecken aus mehr Zellen reichen durch mehrere Zellschichten hindurch und weisen in diesen verschiedenen Schichten eine ähnliche Begrenzung auf. Da nach dieser periklinalen Teilung keine Entmischungen mehr stattfanden, so brauchen die unterschiedlichen Verhältnisse während der letzten Zellteilungen nicht mehr berücksichtigt zu werden. Es sind nicht die Zahlen der verschieden dicht

liegenden und der verschieden großen grünen und weißen Zellen zu vergleichen, sondern nur die Arealgrößen. Der Vergleich erfolgte durch Ausplanimetrieren, resp. durch Wägungen der grünen und weißen Areale an stark vergrößerten Photographien. Die Flächenwerte wurden auf die Zahlen grün werdender Zellen umgerechnet. Auf solche Weise kommt man in der Minimalfläche auf 68600 Zellen in der Maximalfläche auf 103500 Zellen. Vergleicht man die Werte mit den Zahlen der Tabelle 3, so kommt man trotz der sehr großen Unterschiede der Arealgrößen und Zellzahlen in beiden Fällen auf etwa 18 Zellteilungsfolgen. Durch die mit

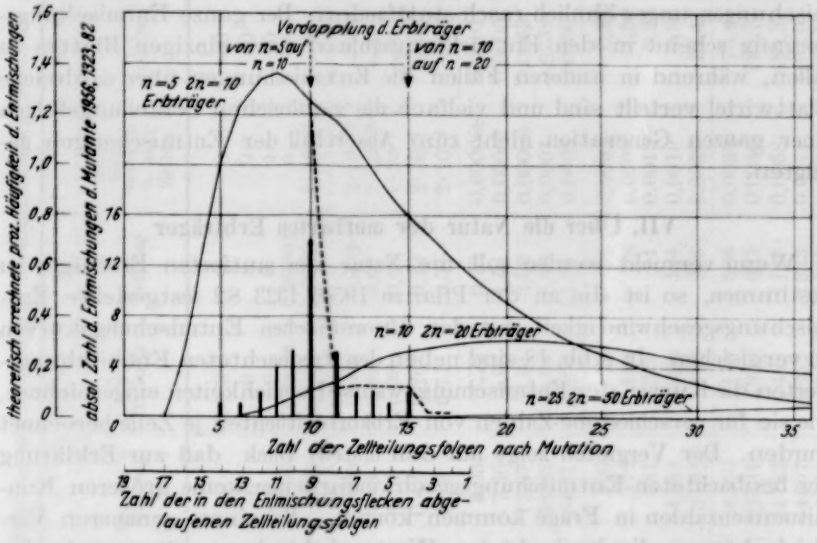

theoretisch errechnete proz. Häufigkeit d. Entmischungen
absol. Zahl d. Entmischungen d. Mutante 1956. 1323. 82
Verdopplung d. Erbträger
von n=5 auf n=10
von n=10 auf n=20
n=5 2n=10 Erbträger
n=10 2n=20 Erbträger
n=25 2n=50 Erbträger
Zahl der Zellteilungsfolgen nach Mutation
Zahl der in den Entmischungsflecken abgelaufenen Zellteilungsfolgen

Abb. 18. Vergleich der theoretischen Entmischungskurven mit der Entmischungsgeschwindigkeit der Mutante auf Schecke 1956.1323. 82. Die senkrecht stehenden Säulen geben die Häufigkeit der Entmischungen bei der Mutante der Pflanze 1956. 1323. 82 an, gemessen an der Zahl der in den verschiedenen Entmischungsflecken abgelaufenen Zellteilungsfolgen. Als Zahl der insgesamt in der mutierten Zelldeszendenz abgelaufenen Zellteilungsfolgen sind 19 Zellteilungsfolgen angenommen. Die Kurven geben die theoretisch zu erwartende Häufigkeit der in jeder Zellteilungsfolge neu auftretenden Entmischungen an, wenn die Zahl der sich zufallsgemäß entmischenden Erbträger je Zelle $n = 5$, $n = 10$ und $n = 25$ ist. Die punktierte Kurve ist unter der Annahme errechnet, daß nach zehn Zellteilungsfolgen einer Entmischung bei $n = 5$ die Zahl der Erbträger auf $n = 10$ und nach weiteren fünf Zellteilungsfolgen nochmals auf $n = 20$ verdoppelt wird

jeder Zellteilung stattfindende Verdoppelung der Zellen entstehen so große Unterschiede, daß ihnen gegenüber die bei der Abgrenzung der Areale auftretenden Fehlermöglichkeiten kaum ins Gewicht fallen. Es können ungünstigenfalls nur Fehlschätzungen von $\pm$ einer Zellteilungsfolge entstehen.

Überblickt man nun die Zahlen, so kommt man auf Grund der Fleckenauszählungen zu folgender Schätzung der Entmischungsgeschwindigkeiten (Abb. 18): Die erste homoplasmonisch mutierte Zelle muß verhältnismäßig bald (fünf bis zehn Zellteilungsfolgen) nach der Mutation des Erbträgers aufgetreten sein. Bis zum Höhepunkt der Entmischungen verliefen dann ungefähr fünf weitere Zellteilungsfolgen, nach denen die Häufigkeit der Entmischungen wieder abfiel. In den

letzten drei Zellteilungsfolgen fanden keine Entmischungen mehr statt, obwohl die Zahl der sich teilenden Zellen hier besonders groß ist und damit die Wahrscheinlichkeit steigt, auch sehr seltene Entmischungen zu finden. Für die Zelldeszendenz der Zelle mit dem ersten mutierten Erbträger sind ungefähr 18 Zellteilungsfolgen anzusetzen. Es ist selbstverständlich, daß diese Schätzungen nur der Größenordnung nach bewertbar sind. Sie lassen aber doch eindeutig erkennen, daß die Entmischungen ungewöhnlich rasch stattfanden. Der ganze Entmischungsvorgang scheint in den Entwicklungsablauf eines einzigen Blattes zu fallen, während in anderen Fällen die Entmischungen über zahlreiche Blattwirtel verteilt sind und vielfach die zahlreichen Zellteilungsfolgen einer ganzen Generation nicht zum Abschluß der Entmischungen genügten.

VII. Über die Natur der mutierten Erbträger

Wenn versucht werden soll, die Natur der mutierten Erbträger zu bestimmen, so ist die an der Pflanze 1956.1323.82 festgestellte Entmischungsgeschwindigkeit mit den theoretischen Entmischungskurven zu vergleichen. In Abb. 18 sind neben den beobachteten Entmischungswerten die Kurven der Entmischungswahrscheinlichkeiten eingezeichnet, wie sie für verschiedene Zahlen von Erbkonstituenten je Zelle berechnet wurden. Der Vergleich zeigt auf den ersten Blick, daß zur Erklärung der beobachteten Entmischungsgeschwindigkeiten keine größeren Konstituentenzahlen in Frage kommen können. Bei einem genaueren Vergleich können die beobachteten Werte nicht ohne weiteres mit den theoretisch ermittelten Werten verglichen werden, sondern die errechneten Prozentwerte sind auf die Zellzahlen zu beziehen, die in den einzelnen Zellgenerationen zu erwarten sind. Die durch eine solche Umrechnung erhaltenen Werte sind in Tabelle 6 wiedergegeben. Nach dieser Tabelle wären die ersten homoplasmonisch mutierten Zellen bei $n = 5$ sechs bis acht Zellteilungsfolgen nach der Mutation zu erwarten. Bei $n = 10$ sind bis zum Auftreten solcher Zellen zehn bis zwölf, bei $n = 25$ aber schon siebzehn bis zwanzig Zellteilungsfolgen notwendig. Bei dem untersuchten Objekt war diese Zeitspanne auf fünf bis zehn Generationen geschätzt worden.

Vom Zeitpunkt der ersten Entmischungen an sollte nach den Zahlen der Tabelle 6 die Zahl der neu entstehenden homoplasmonisch entmischten Zellen kontinuierlich zunehmen. Der in den Entmischungskurven der Abb. 18 nach dem Entmischungsmaximum deutlich festzustellende Abfall der Entmischungswahrscheinlichkeit ist in Tabelle 6 nicht mehr zu erkennen, da die Zellzahl mit jeder Zellteilungsfolge viel stärker zunimmt, als die Entmischungswahrscheinlichkeiten abnehmen. In einer Zellpopulation, in der sich wie im Blatt alle Zellen $\pm$ gleich-

Tabelle 6. *Wahrscheinlichkeit der bei jeder Zellteilung neu entstehenden homoplasmonisch mutierten Zellen*

Zahl der Zellteilungsfolgen	$n=5,\ 2n=10$				$n=10,\ 2n=20$				$n=25,\ 2n=50$			
	Absoluter Wert in % aller Zellen	bei 100 % Teilung	bei 90 % Teilung	bei 75 % Teilung	Absoluter Wert in % aller Zellen	bei 100 % Teilung	bei 90 % Teilung	bei 75 % Teilung	Absoluter Wert in % aller Zellen	bei 100 % Teilung	bei 90 % Teilung	bei 75 % Teilung
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0,24	0,020	0,017	0,013	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0,66	0,105	0,086	0,062	0,0001	0,00002	0,00001	0,00001	0	0	0	0
5	1,01	0,324	0,251	0,166	0,002	0,0006	0,0005	0,0003	$1\cdot10^{-16}$	~0	~0	~0
6	1,24	0,79	0,58	0,35	0,01	0,006	0,005	0,003	$3\cdot10^{-12}$	~0	~0	~0
7	1,34	**1,72**	**1,20**	0,68	0,03	0,03	0,02	0,01	$7\cdot10^{-10}$	~0	~0	~0
8	1,37	3,50	2,32	**1,20**	0,05	0,13	0,08	0,04	$1\cdot10^{-8}$	~0	~0	~0
9	1,33	6,81	4,30	2,05	0,08	0,42	0,26	0,13	$2\cdot10^{-7}$	~0	~0	~0
10	1,26	24,92	7,74	3,40	0,12	**1,19**	0,71	0,31	$2\cdot10^{-6}$	~0	~0	~0
11	1,18	24,1	13,7	5,5	0,15	3,03	**1,72**	0,70	0,000008	0,0001	0,0001	0,00004
12	1,08	44,2	23,9	8,9	0,18	7,50	4,05	**1,51**	0,00001	0,0005	0,0003	0,0001
13	0,99	80,7	41,4	14,2	0,21	17,37	8,91	3,06	0,00008	0,0063	0,0032	0,0011
14	0,89	146,0	71,2	22,5	0,24	38,83	18,94	5,99	0,0001	0,0238	0,0116	0,0037
15	0,80	263,1	121,9	35,5	0,26	84,21	39,02	11,36	0,0003	0,0950	0,0440	0,0128
16	0,72	471	207	56	0,27	179	78	21	0,0005	0,33	0,15	0,04
17	0,65	846	354	87	0,28	372	156	38	0,0008	**1,09**	0,45	0,11
18	0,58	1510	600	136	0,29	781	310	71	0,0013	3,28	**1,30**	0,29
19	0,52	2705	1021	214	0,30	1562	590	124	0,0019	9,86	3,72	0,78
20	0,46	4802	1722	332	0,30	3125	1120	216	0,0026	27,47	9,85	**1,90**
21	0,41	8557	2914	518	0,30	6250	2128	378	0,0035	73,6	25,1	4,5
22	0,36	15267	4939	809	0,30	12331	3990	653	0,0046	195,7	61,9	10,1
23	0,32	27017	8353	1260	0,29	24182	7477	1128	0,0058	480,3	148,5	22,4
24	0,29	45438	14108	1960	0,29	44807	13912	1933	0,0071	1192,9	348,3	48,4
25	0,26	86235	23921	3061	0,28	92946	25782	3299	0,0085	2852,1	791,2	101,2

mäßig teilen, müßte die Zahl der neu entstehenden homoplasmonischen Zellen dauernd zunehmen. Die Abnahme der Entmischungen wird nur dort festzustellen sein, wo das Wachstum zur Hauptsache einer eng begrenzten Zahl von Initialzellen zugeteilt ist und die abgegebenen Zellen in ± kurzer Zeit ihre Teilungen einstellen, wie z. B. in einem einzelnen Sproßvegetationspunkt.

Mit diesen Forderungen stimmen nun die Beobachtungen an dem untersuchten *Epilobium*-Blatt keineswegs überein. Die Zahl der neu angelegten Entmischungsflecken nimmt in den letzten sechs bis acht Zellteilungsfolgen des Blattes eindeutig wieder ab. Wie kommt dieser Unterschied gegenüber den theoretischen Erwartungen zutande? Es sind mehrere Erklärungsmöglichkeiten gegeben: 1. Eine Abnahme kommt, wie erwähnt, dann zustande, wenn die Zahl der sich teilenden Zellen und damit auch die Zahl der neu entstehenden Zellen rasch abnimmt. Diese Erklärungsmöglichkeit kommt nicht in Frage, nachdem festgestellt wurde, daß das Verhältnis von drei- und vierzelligen Teilungs- und Entmischungsgruppen in allen Entwicklungsstadien des Blattes ungefähr gleich ist und der Anteil der sich teilenden Zellen bis in die letzten Zellteilungsfolgen nicht verändert wird. — 2. Die Zahl der neu entstehenden Entmischungsflecken kann abnehmen, wenn in den letzten Zellteilungsfolgen die Erbträger nicht mehr zufallsgemäß auf die Tochterzellen verteilt werden. Für ein solches Verhalten liegt keinerlei Hinweis vor. Die einzelnen Flecken sind zufallsgemäß angeordnet. — 3. Wenn normale und mutierte Erbträger nicht mehr im gleichen Rhythmus vermehrt werden. Wenn die die Ergrünung ermöglichenden Erbträger langsamer vermehrt werden, so ist ebenfalls eine Abnahme der grünen Flecken zu erwarten. Auch für ein solches Verhalten liegen keine Hinweise vor, und es ist nicht gerade wahrscheinlich, daß sich die Erbträger schneller vermehren, die das Ergrünen der Zellen verhindern. — 4. Schließlich kann die Entmischungswahrscheinlichkeit sehr rasch abnehmen, wenn die Zahl der sich entmischenden Erbträger je Zelle steigt. Diese Erklärungsmöglichkeit erscheint am wahrscheinlichsten, da eine Zunahme der Plastidenzahlen (Fasse 1955), der Mikrosomenzahlen usw. im Laufe der Entwicklung durchaus bekannt ist. Wird z. B. die Zahl der Erbträger von $n = 5$ dadurch auf $n = 10$ verdoppelt, daß sich die Erbträger nicht im selben Rhythmus teilen wie die Zellen, sondern eine zusätzliche Teilung durchmachen, so sinkt die Zahl der neu entstehenden Entmischungszellen annähernd auf die für $n = 10$ gültigen Werte ab. Es werden nicht ganz genau die für die entsprechende Zellgeneration errechneten Werte erreicht, da die Entmischung bei $n = 5$ schneller vor sich ging als bei $n = 10$ und der Entmischungsgrad von der Zahl der noch vorhandenen heteroplasmonischen Zellen abhängt. Die hierdurch entstehenden Unterschiede gegenüber der typischen Kurve für $n = 10$

fallen in diesem Zusammenhange aber nicht ins Gewicht und können vernachlässigt werden.

Welche Komponenten des extranucleären Protoplasmas kommen nun in Zahlen von ungefähr 10 je Zelle vor und werden während der letzten Wachstumsstadien des Blattes auf ein Mehrfaches dieser Zahl vermehrt? Allein solche Komponenten können die bei Pflanze 1956. 1323.82 mutierten Erbträger enthalten.

Leider konnten im Verlaufe der bisher bei den verschiedensten Objekten durchgeführten cytologischen Untersuchungen die hier benötigten Zahlen nur in Ausnahmefällen bestimmt werden. Es kann nicht angegeben werden, in welchen Bereichen sie bei den einzelnen Objekten und in ihren verschiedenen Entwicklungsstadien schwanken. Auch die bei *Epilobium* eingeleiteten Untersuchungen (BARTELS) werden noch einiger Zeit bedürfen, um endgültige Aussagen über die Zahlenverhältnisse der Plasmakonstituenten zu erlauben. Zur Zeit sind nur einige vorläufige Zählungen, meistens von ausdifferenzierten Zellen, verfügbar, die aber doch zur Feststellung der Größenordnung ausreichend sein dürften.

Bei einigen mütterlich vererbten Schecken ohne Mischzellen wurde auf Grund der sehr langsamen Entmischungsgeschwindigkeiten eine Chondriosomen- oder Sphaerosomenvererbung vermutet (MICHAELIS 1955). Die Beobachtung der Sphaerosomen in lebenden ausgewachsenen Zellen zeigt sehr hohe Zahlen je Zelle, deren genauere Zählung aber wegen der Plasmaströmung und wegen der Tiefenerstreckung der Zellen erhebliche Schwierigkeiten bereitet. An fixierten Präparaten, in denen allerdings die Sphaerosomen nicht immer sicher gegen die Chondriosomen abzugrenzen waren, wurden kurz vor Abschluß der Zellteilungen im plasmatischen Wandbelag einer Zellhälfte über 500 Sphaerosomen gezählt, so daß für die gesamte Zelle weit über 1000 Sphaerosomen angenommen werden müssen. Wenn auch die Zahlen in den jüngsten Zellen noch unbekannt sind, so dürften die Sphaerosomen doch als Träger der bei Pflanze 1956.1323.82 mutierten Erbeinheiten nicht in Frage kommen. Dasselbe gilt wohl auch für die Chondriosomen, deren Zahl zwar geringer ist, aber ebenfalls zur Erklärung der beobachteten Entmischungsgeschwindigkeiten zu hoch sein dürfte.

Anders liegen die Verhältnisse bei den Plastiden. Bei Zählungen in ausdifferenzierten Zellen wurden in verschiedenen Geweben sehr verschiedene Zahlen festgestellt. Wie an anderer Stelle (MICHAELIS 1957b) näher zu belegen ist, wurden in der *Epilobium*-Blattepidermis Plastidenzahlen zwischen 7 und 15 mit einem ausgesprochenen Häufigkeitsmaximum bei 12 Plastiden je Zelle beobachtet. In den Palisadenzellen kommen Zahlen um 25, im Schwammparenchym Zahlen zwischen 45 und 65 und in den besonders großen Zellen, die die Nerven begleiten, Zahlen von weit über 100 vor. Bei Schecken, in denen die Plastidendegeneration schon sehr früh einsetzt, wurden in den Palisadenzellen Zahlen zwischen 7 und 20, im Schwammparenchym teils Zahlen um 25,

teils Zahlen um 10 beobachtet. In sehr jungen Zellen kommen in soeben geteilten Zellen Zahlen um 10, in Zellen vor der Teilung Zahlen um 20 vor. Auf Grund solcher Zählungen darf man wohl annehmen, daß im jungen, noch teilungsfähigen Gewebe Plastidenzahlen vorliegen, die durchaus in die Größenordnung fallen, die auf Grund der Entmischungsgeschwindigkeiten errechnet wurden. In verhältnismäßig späten Stadien der Blattentwicklung scheinen diese niedrigen Zahlen erhöht zu werden. In den Palisadenzellen scheint gegenüber dem im Meristem alternierenden Rhythmus von Zell- und Plastidenteilung eine zusätzliche Plastidenteilung zu erfolgen, wodurch die Plastidenzahl ungefähr verdoppelt wird. Im Schwammparenchym scheint sich dieser Vorgang ein zweites Mal, in anderen Zellen eventuell sogar ein drittes und viertes Mal zu wiederholen.

In den palisadenähnlichen grünen Zellen aus der Blattunterseite der Mutante an Pflanze 1956.1323.82 sind Plastidenzahlen um und über 50 zu zählen. Es dürfte damit berechtigt sein, hier ebenfalls eine zweimalige Verdoppelung der ursprünglichen Plastidenzahlen anzunehmen, wie sie auch im normalen Gewebe der Blattunterseite üblich ist. Plastidenzählungen in den weißen Schwammparenchymzellen der Mutante waren wegen der starken Degeneration der Plastiden nicht mehr durchzuführen. Ganz allgemein erfolgte bei der Scheckung der Pflanze 1956.1323.82 die Plastidendegeneration aber erst in einem relativ späten Blattalter, nachdem die Zellen ihren vollen Plastidenbestand erhalten hatten und die Plastiden schon ergrünt waren.

Da die Zahl der Plastiden durchaus in den Größenbereich fällt, der aus der Entmischungsgeschwindigkeit der mutierten Plasmonkonstituenten errechnet worden war und nachdem die Zunahme der Plastidenzahl im Laufe der Blattentwicklung sogar die Abweichung der Fleckenzahl von der typischen Entmischungskurve zu erklären vermag, so mag es trotz mancher Unvollkommenheiten der angewandten Methode berechtigt sein, die bei Pflanze 1956.1323.82 mutierten Erbträger in den Plastiden zu suchen. Auch wenn man alle Täuschungs- und Fehlermöglichkeiten in Betracht zieht, so ist im Gegensatz zu anderen Schecken ohne Mischzellen eine Lokalisierung der Scheckungsgene in anderen Komponenten des Zellplasmas nicht möglich.

Schluß und Zusammenfassung

Dieses hier näher geschilderte Beispiel einer Plastidenabänderung ist in mehrfacher Weise von besonderem Interesse. Es wurde hier eine Scheckung gefunden, die durch Plastogene bedingt ist, der aber trotzdem die Plastidenmischzellen fehlen, die sonst für eine Plastidenvererbung kennzeichnend sind. Dieser Fall wäre sehr überraschend gewesen, wenn nicht unter den Schecken mit echten Mischzellen schon einzelne Beispiele gefunden worden wären, in denen in heteroplastomatischen Zellen durch Wechselwirkungen zwischen genetisch unterschiedlichen

Plastiden einzelnen Plastiden eine Entwicklung aufgezwungen worden wäre, die der genetischen Veranlagung dieser Plastiden nicht entsprach. Innerhalb der Zelle entsteht durch Wechselwirkung nicht nur der verschiedenen Protoplasmakomponenten wie Zellkern, Plastiden, Chondriosomen usw. und Cytoplasma, sondern auch durch enge Wechselbeziehungen zwischen den homologen Plasmakomponenten ein System, in dem ein Reaktionsablauf ohne die Berücksichtigung aller Systemglieder kaum richtig erkannt werden kann. In dem vorliegenden Fall scheinen von den zu „farblos" mutierten Plastogenen Stoffe auszugehen, die direkt oder indirekt zu einer Degeneration genetisch normaler Plastiden führen. Dabei genügt offenbar die von einem einzigen Plastid produzierte Stoffmenge, um das gesamte übrige Plastidom zu verändern. Dieser Stoff bleibt aber auf die Einzelzelle beschränkt und vermag nicht in die Nachbarzellen zu wandern. Ganz ähnliche Reaktionsabläufe können aber auch von Genen ausgehen, die in den Chromosomen, in den Sphaerosomen oder im Cytoplasma lokalisiert sein können.

Das untersuchte Beispiel ist weiterhin für die Methodik der Plasmonanalyse von Interesse. In einem System mit so komplizierten Wechselbeziehungen der Systemglieder zueinander, wie es die Zelle ist, wird es selten möglich sein, im Phänotypus des Objektes Erbreaktionen zu erfassen, die nur von einem einzigen Erbträger abhängig sind. Damit entfällt die Möglichkeit, aus dem Ort einer physiologischen Reaktion auf die Lokalisation der maßgeblichen Erbträger zu schließen. Es darf z. B. aus der mütterlichen Vererbung von Plastideneigenschaften nicht ohne weiteres auf eine Plastidenvererbung geschlossen werden. Zur Lokalisierung der Erbträger müssen genetische Methoden eingesetzt werden, die wirklich für das Verhalten der zu untersuchenden Plasmaanteile spezifisch sind. Es ist erstaunlich, wie wenig dieser fast selbstverständlichen logischen Forderung Folge geleistet wurde.

Bisher erschien es möglich, eine Plastidenvererbung von einer extraplastidalen Plasmavererbung an Hand des Vorkommens oder des Fehlens von Mischzellen zu trennen. Soweit wir jetzt übersehen, ist es zwar möglich, aus dem Vorkommen echter Mischzellen auf das Vorliegen einer echten Plastidenvererbung zu schließen. Beim Fehlen von Mischzellen ist es aber nicht möglich, eine Plastidenvererbung mit Sicherheit auszuschließen. Eine Entscheidung ist hier nur auf Grund einer weiteren Plasmonanalyse möglich.

An Hand des geschilderten Beispieles lassen sich nun auch die wichtigsten Prinzipien einer Plasmonanalyse demonstrieren. Ausgegangen wurde von einem Erbunterschied, der durch spontane Mutation entstanden war. Ebenso hätte man von einer experimentell induzierten Mutation oder von einer Plasmamischung (z. B. bei Befruchtung) aus-

gehen können. Die analytische Methode wurde aufgebaut auf den unterschiedlichen Zahlen, in denen die einzelnen Plasmakomponenten je Zelle vorkommen und die bei zufallsgemäßer Umkombination zu verschiedenen Entmischungsgeschwindigkeiten führen. Ebenso kann eine Plasmonanalyse aber auch auf anderen Unterschieden im Verhalten der Erbträger während ihrer Vermehrung und Verteilung ausgehen. Entscheidend ist die Erkenntnis, daß die Untersuchung dieser Vorgänge schon intraindividuell erfolgen kann, daß sogar bei gynogamen Organismen[1] nur eine intraindividuelle Plasmonanalyse sinnvoll ist. Die Analyse eines durch intraindividuelle Umkombination entstandenen Musters erfordert nun aber erheblich abgeänderte Untersuchungsmethoden gegenüber der Analyse von Populationen aus Individuen in den verschiedenen Folgegenerationen. Ebenso wie eine saubere Trennung der Deszendenzlinien und der einzelnen Generationenfolgen unter den generativen Nachkommen notwendig ist, ist eine Trennung der einzelnen Zelldeszendenzlinien und Zellteilungsfolgen bei der genetischen Analyse intraindividueller Muster nötig. Hier beginnen nun die großen Schwierigkeiten, da die bisherigen entwicklungsgeschichtlichen Kenntnisse als Grundlage für eine Plasmonanalyse nicht ausreichen. Es wurde versucht, diese Kenntnisse weiter auszubauen und die bisherigen Untersuchungsmethoden durch Methoden zu ergänzen, die für den genetischen Untersucher besondere Vorteile bieten. Im Verlauf dieser Untersuchungen ergab sich, daß während der Entwicklung von *Epilobium* größere Gesetzmäßigkeiten bestehen, als das bisher zu erkennen und zu erhoffen war. Es bleibt abzuwarten, ob sich andere Objekte ähnlich verhalten. Diese entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen können zur Zeit nur als erste Ansätze gewertet werden, und es wird noch vieler Arbeit von den verschiedensten Seiten bedürfen, bis alle Möglichkeiten ausschöpfbar sind und bei der Plasmonanalyse alle Fehlermöglichkeiten genau beurteilt werden können. Wenn in dem hier vorliegenden Falle trotz dieser Schwierigkeiten eine relativ sichere Lokalisierung der mutierten Erbeinheiten in den Plastiden möglich war, so beruht das darauf, daß in dem zur Untersuchung ausgewählten Beispiel eine Anzahl besonders günstiger Voraussetzungen zusammentraf und daß die Unterschiede in der Zahl der in Betracht kommenden Plasmakomponenten und die dadurch entstehenden Entmischungsunterschiede wesentlich größer sind als die noch in der Methode liegenden Fehlermöglichkeiten.

Zur Abschätzung der Entmischungsgeschwindigkeit waren folgende drei Bestimmungen notwendig: 1. Es mußte der Ort der ersten Plastidenmutation bestimmt werden. Er ist in nächster Nähe des Punktes zu suchen, in dem alle sich entmischenden Zelldeszendenz-

[1] Gynogam = das Plasma der Zygote stammt ausschließlich von der Mutter.

linien zusammenlaufen, sofern nur jede Zelldeszendenz genügend Zeit zur Entmischung findet (Abschnitt IV). 2. Die Wirkungsweise der mutierten Erbträger wurde aus dem Muster bestimmt, das kürzeste heteroplasmonische Zelldeszendenzlinien bilden (Abschnitt V). 3. Schließlich war es notwendig, die Zahl der Zellteilungsfolgen zu bestimmen, die zwischen Mutation und Auftreten abgeänderter Zellen verstreichen, resp. die Zahl der Zellteilungsfolgen festzulegen, die die abgeänderten Zellen bis zur Fertigstellung des Blattes durchlaufen. Als Maß hierfür diente die Zahl der Zellen in den einzelnen abgeänderten Flecken (Abschnitt VI).

Die entwicklungsgeschichtlichen Verhältnisse wurden an Hand von Zelldeszendenzlinien geklärt, die durch eine genetische Abänderung markiert waren. Solche Zelldeszendenzen bildeten stets wiederkehrende, charakteristische Muster. Die Größenordnung dieser Muster ist in einem gleichmäßig wachsenden Gewebe mit der Reihenfolge der Zellteilungen korreliert, in denen diese Muster angelegt wurden. Aus der Wiederholung einer genetischen Abänderung in den Teilmustern benachbarter Organe und Gewebe läßt sich eine Zugehörigkeit der Teilmuster zur gleichen Zelldeszendenz erschließen, falls die Häufigkeit dieser Wiederholungen größer ist als das zufällige Zusammentreffen neu entstehender Abänderungen (Abschnitt III, 1 und besonders IV, 3). Mit Hilfe dieser Prinzipien lassen sich die Zellteilungsabläufe in den allerjüngsten Blattanlagen bestimmen. Während des Flächenwachstums des Blattes teilen sich die Zellen offenbar in relativ regelmäßigen Rhythmen. Die Blattform wird im wesentlichen durch die Dauer dieser Zellteilungstätigkeit und durch die Orientierung der Zellteilungsebenen bestimmt. Abweichungen von einem regelmäßigen Zellteilungsrhythmus können durch das Vorkommen von Zellgruppen erkannt werden, die nicht der Reihe 2^n (1—2—4—8—16 usw.) angehören (Abschnitt VI, 1).

Literatur

Bartels, F.: Zur Entwicklung der Keimpflanze von Epilobium hirsutum. I. Die im Proembryo ablaufenden Zellteilungen bis zum beginnenden „herzförmigen Embryo". Flora (Jena) **144**, 105—120 (1956). — Baur, E.: Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der „Varietates albomarginatae hort." von Pelargonium zonale. Z. Vererbungslehre **1**, 330—351 (1909). — Correns, C., u. F. v. Wettstein: Nicht mendelnde Vererbung. In Handbuch der Vererbungswissenschaft. Berlin 1937. 159 S. — Dangeard, P. A.: Sur la distinction du chondriome des auteurs en vacuome, plastidome et sphérome. C. r. Acad. Sci. Paris **169**, 1005 (1919). — Fasse-Franzisket, U.: Die Teilung der Proplastiden und Chloroplasten bei Agapanthus umbellatus l'Herit. Protoplasma (Wien) **45**, 194—227 (1955). — Imai, U.: The behaviour of the plastid as a hereditary unit: The theory of the plastogene. Cytologia (Tokyo) Fujii-Festschr. **1937**, 934—947. — Michaelis, P.: Wege und Möglichkeiten zur Analyse des plasmatischen Erbgutes. Biol. Zbl. **73**,

353—394 (1954). — Modellversuche zur Plastiden- und Plasmavererbung. Züchter **25**, 209—221 (1955a). — Über Gesetzmäßigkeiten der Plasmon-Umkombination und über eine Methode zur Trennung einer Plastiden-, Chondriosomen-, resp. Sphaerosomen- (Mikrosomen-) und einer Zytoplasmavererbung. Cytologia (Tokyo) **20**, 315—338 (1955b). — Über die Vererbung von Plastidenmerkmalen. Protoplasma (Wien) **48**, 403—418 (1957a). — Genetische, entwicklungsgeschichtliche und cytologische Untersuchungen zur Plasmavererbung. I. Die Plastidenvererbung und das Problem der heteroplastidischen „Misch"-Zellen. In Vorbereitung (1957b). — Renner, O.: Die pflanzlichen Plastiden als selbständige Elemente der genetischen Konstitution. Ber. sächs. Akad. Wiss. Leipzig, Math.-physische Kl. **86**, 241—266 (1934). — Weier, T. E., and C. R. Stocking: The chloroplast: Structure, Inheritance and Enzymology. Bot. Review **18**, 14—75 (1952).

Dr. P. Michaelis, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln-Vogelsang

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u. a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse (höchstens 1 Seite) anzufügen, die in Deutsch oder Englisch oder Französisch abgefaßt sein kann.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).

Erinnerungen eines Biologen

Von **Karl von Frisch.** Mit einem Porträt, 39 Textabbildungen, einem Aquarell und einem Stammbaum. V, 172 Seiten Gr.-8°. 1957. Ganzleinen DM 26.—

Inhaltsübersicht: Woher des Weges. Schulzeit. Auf der Universität. Als Assistent am Münchner Zoologischen Institut. Habilitation und weitere Assistentenjahre in München. Zwischenspiel im Rudolfinerhaus (1914—1918). Zur Zoologie zurück. Als Ordinarius in Rostock (1921—1923). Breslau (1923—1925). Wieder in München. Amerikareise 1930. Im neuen Institut. Zweiter Weltkrieg. Stille Arbeit in Brunnwinkl 1945/46. Graz 1946—1950. Zweite Amerikareise (1949). Zum fünftenmal nach München. Verzeichnis der Arbeiten. Namen- und Sachverzeichnis.

Als Professor v. Frisch kürzlich seinen 70. Geburtstag beging, kamen seine Schüler aus aller Welt zusammen und bereiteten ihm ein großes Familienfest. Seine Tätigkeit als Hochschullehrer, seine populären Bücher und die faszinierenden Ergebnisse seiner wissenschaftlichen Arbeit haben ihn in weiten Kreisen bekannt gemacht. Der Leser erfährt aus seiner Selbstbiographie, wie schon in der Kinderzeit seine Neigungen in der kultivierten österreichischen Gelehrtenfamilie, der er entstammt, gefördert wurden, wie er später durch den 1. Weltkrieg fast der Zoologie untreu geworden wäre und dann doch zu seinem geradlinigen Gelehrtenleben zurückkehrte, wie ein Problem aus dem anderen erwuchs, und er lernt zugleich ein gutes Stück biologischer Wissenschaftsgeschichte kennen.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Handbuch der Pflanzenphysiologie
Encyclopedia of Plant Physiology

Herausgegeben von **W. Ruhland,** Unterdeufstetten, in Gemeinschaft mit E. Ashby, Belfast, J. Bonner, Pasadena, M. Geiger-Huber, Basel, W. O. James, Oxford, A. Lang, Los Angeles, D. Müller, Kopenhagen, M. G. Stålfelt, Stockholm. In 18 Bänden. Jeder Band ist einzeln käuflich.

Im Spätherbst wird erscheinen:

6. Band:

Aufbau, Speicherung, Mobilisierung und Umbildung der Kohlenhydrate

Formation, Storage, Mobilization, and Transformation of Carbohydrates

Bearbeitet von B. Åberg, H. G. Albaum, A. Arnold, N. P. Badenhuizen, E. J. Bourne, G. Dangschat, G. Fåhraeus, H. Fischer, A. B. Foster, J. Goerdeler, A. Gottschalk, W. Z. Hassid, F. Haurowitz, R. J. Helder, F. A. Henglein, E. L. Hirst, J. K. N. Jones, E. Jucker, G. Kerstan, J. A. Lovern, E. V. Miller, G. Neumüller, R. D. Preston, B. G. Rånby, F. Shafizadeh, M. Stacey, A. Stoll, S. Veibel, B. Vollmert, A. Wagner, H. Wanner, H. Weber, W. J. Whelan, J. Wolf, M. L. Wolfrom, E. G. Young. Redigiert von **A. Arnold,** Stuttgart. Mit 156 Abbildungen. Etwa 1200 Seiten Gr.-8°. 1957.

Vorbestellpreis gültig bis zum Erscheinen Ganzleinen DM 214.40.

Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen Ganzleinen DM 268.—.

Bei Verpflichtung zur Abnahme des Gesamtwerkes gilt der Vorbestellpreis auch nach Erscheinen des Bandes weiter als Subskriptionspreis, jedoch ist jeder Band zum Ladenpreis einzeln käuflich.

Inhaltsübersicht: **Einleitung und Übersicht.** — **Die biogenen Kohlenhydrate.** Die Monosaccharide. Die Di-, Tri- und Tetrasaccharide. Die Polysaccharide. The polysaccharides from lower plants such as bacteria, algae, fungi and lichens etc., and the related enzymes. — **Die einfachen Abkömmlinge der Zucker.** Die Zuckeralkohole, Struktur, Eigenschaften, Bildung und Vorkommen usw. Die Aldonsäuren. Die Uron- und Polyuronsäuren (Pektin und Alginsäure). Ascorbic acid. The gums and mucilages of plants. The aminosugars and chitin. — **Die wichtigsten zuckerhaltigen Verbindungen.** Ester. Die Heteroside. Glycoproteins (mucoproteins). Glycolipids. — **Die Speicherung der Kohlenhydrate.** Morphologisch-anatomische Grundlagen der Speicherung. Bedeutung der Speicherung. Physiologie der Speicherung. Der Transport der Kohlenhydrate.— **Die Mobilisierung der gespeicherten Kohlenhydrate.** Mobilisierung der Kohlenhydrate bei der Keimung. Tagesperiodische Auswanderung der Kohlenhydrate aus dem Blatt. Jahresperiodische Auswanderung der Kohlenhydrate aus den Speichergeweben und -organen. Herbstliche Rückwanderung der Kohlenhydrate. — **The excretion of carbohydrates (nectaries).** — **Die Beziehungen der Kohlenhydrate zum übrigen Stoffwechselgeschehen.** — Namenverzeichnis — Author Index. — Sachverzeichnis (Deutsch-Englisch). — Subject Index (English-German). — Jeder Beitrag enthält ein Literaturverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany